

Universität Rostock
Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie
Direktorin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

**Der Einfluss von E2F1 und VEGFR-3 auf die
Neoangiogenese am amelanotischen Melanom**

Eine intravitalmikroskopische Studie
im Modell der dorsalen Rückenhautkammer der Maus

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von
Christian Paul Mayrhofer
geboren am 21.11.1988 in Wien, Österreich

Rostock 2018

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Steffen Emmert, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke, Ph.D., Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes

Verteidigung: 17.09.2019

Index

I. Abbildungsverzeichnis	3
II. Glossar.....	4
1. Einleitung	5
1.1 Tumorbiologie.....	5
1.1.1 Wachstum und Progression.....	5
1.1.2 Tumor- und Neoangiogenese	6
1.2 Tumorthherapie.....	9
1.2.1 Allgemeine Therapien.....	9
1.2.2 <i>Targeted Therapy</i>	10
1.2.3 Anti-angiogene Therapien	11
1.3 E2F-Familie	12
1.3.1 e2f-Transkriptionsfaktoren.....	12
1.3.2 E2F1.....	15
1.4 Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren	16
1.4.1 vegf und ihre Rezeptoren	16
1.4.2 VEGFR-3.....	17
1.5 Zielsetzung der Studie	18
2. Material und Methoden.....	19
2.1 Versuchstiere	19
2.2 Tumorzellen	19
2.2.1 Zelllinien.....	19
2.2.2 Knockdown sowie Überexpression von E2F1	19
2.2.3 VEGFR-3-Knockdown und Inaktivierung von vegfr-3.....	20
2.3 Modell.....	21
2.3.1 Chirurgische Präparation der Rückenhautkammer.....	21
2.3.2 Zellvorbereitung zur Transplantation	25
2.3.3 Zelltransplantation	26
2.4 Intravitale Epifluoreszenz-Videomikroskopie.....	27
2.4.1 Farbstoff	27
2.4.2 Datenaufnahme.....	27

2.5 Histomorphologie	28
2.5.1 Hematoxylin-Eosin	28
2.5.2 Immunhistochemie	28
2.6 Experimentelles Protokoll	29
2.6.1 Versuchsgruppen	29
2.6.2 Versuchsablauf	30
2.6.3 Offlineanalyse und mikrozirkulatorische Parameter	30
2.7 Statistik	31
3. Ergebnisse	32
3.1 E2F1-Knockdown	32
3.2 VEGFR-3	36
3.2.1 VEGFR-3-Knockdown	36
3.2.2 vegfr-3-Inaktivierung	39
3.3 E2F1-Überexpression	42
4. Diskussion	46
4.1 Zu Material und Methoden	46
4.1.1 Dorsale Rückenhautkammer	46
4.1.2 Untersuchung von Tumorgewebe in Rückenhautkammern	46
4.1.2 Versuchstiere	47
4.1.3 Intravitale Epifluoreszenz-Videomikroskopie	48
4.1.4 Fluoreszenzfarbstoff	48
4.2 Zu den Ergebnissen	49
4.2.1 Neoangiogenese	49
5. Zusammenfassung	53
III. Literaturverzeichnis	55
IV. Danksagung	63
V. Eidesstattliche Erklärung	64
VI. Curriculum Vitae	65
VII. Thesen	67

I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Die Hallmarks of Cancer</i>	6
Abb. 2: Der Angiogenic Switch.....	7
Abb. 3: Gefäßsprossung	8
Abb. 4: Schematische Darstellung des pRB/e2f-Signalwegs	14
Abb. 5: Selektives Gen-Knockdown mittels RNA-Interferenz	20
Abb. 6: Knockdown-Kontrolle	21
Abb. 7: Querschnitt und Aufsicht einer Rückenhautkammer	22
Abb. 8: NMRI nu/nu mit dorsaler Rückenhautkammer.	23
Abb. 9: Schritte der chirurgischen Präparation einer dorsalen Rückenhautkammer	25
Abb. 10: Arbeitsschritte der Zelltransplantation	26
Abb. 11: Intravitalmikroskopische Aufnahme einer tumortragenden Rückenhautkammer	28
Abb. 12: Schematische Darstellung der experimentellen Teilschritte	30
Abb. 13: Makroskopie des Tumorwachstums	33
Abb. 14: Tumorfläche und relative vaskularisierte Tumorfläche im Verlauf (sh.E2F1)	34
Abb. 15: FCD und rFCD (sh.E2F1).....	34
Abb. 16: Intravitalmikroskopische Aufnahme repräsentativer Ausschnitte gefäßtragender Tumorbereiche am 14. Tag (sh.E2F1)	34
Abb. 17: HE gefärbte Schnitte der Tumore am 14. Tag (sh.E2F1).....	35
Abb. 18: Immunhistochemie mit Anti-CD31 der Tumore am 14. Tag (sh.E2F1)	35
Abb. 19: Immunhistochemie mit Anti-PCNA der Tumore am 14. Tag (sh.E2F1).....	35
Abb. 20: Tumorfläche und relative vaskularisierte Tumorfläche im Verlauf (sh.VEGFR-3).....	37
Abb. 21: FCD und rFCD (sh.VEGFR-3)	37
Abb. 22: Intravitalmikroskopische Aufnahme repräsentativer Ausschnitte gefäßtragender Tumorbereiche am 14. Tag (sh.VEGFR-3).....	38
Abb. 23: HE gefärbte Schnitte der Tumore am 14. Tag (sh.VEGFR-3)	38
Abb. 24: Immunhistochemie mit Anti-CD31 der Tumore am 14. Tag (sh.VEGFR-3).	38
Abb. 25: Immunhistochemie mit Anti-PCNA der Tumore am 14. Tag (sh.VEGFR-3)	39
Abb. 26: Immunhistochemie mit Anti-GFP der Tumore am 14. Tag (sh.VEGFR-3).....	39
Abb. 27: Tumorfläche und relative vaskularisierte Tumorfläche im Verlauf (DN-VEGFR-3).	41
Abb. 28: FCD und rFCD im Verlauf (DN-VEGFR-3).....	41
Abb. 29: Intravitalmikroskopische Aufnahme repräsentativer Ausschnitte gefäßtragender Tumorbereiche am 14. Tag (DN-VEGFR-3)	41
Abb. 30: HE gefärbte Schnitte der Tumore am 14. Tag (DN-VEGFR-3)	42
Abb. 31: Immunhistochemie mit Anti-CD31 der Tumore am 14 (DN-VEGFR-3)	42
Abb. 32: Immunhistochemie mit Anti-PCNA der Tumore am 14. Tag (DN-VEGFR-3)	42
Abb. 33: Tumorfläche und relative vaskularisierte Tumorfläche im Verlauf (E2F1 Überexpression)	44
Abb. 34: FCD und rFCD im Verlauf (E2F1 Überexpression)	44
Abb. 35: Intravitalmikroskopische Aufnahme repräsentativer Ausschnitte gefäßtragender Tumorbereiche am 14. Tag (E2F1 Überexpression).	45

II. Glossar

cdk	<i>cyclin dependent kinase</i>
cdki	cdk-Inhibitor
cDNA	komplementäre DNA
DAB	3,3'-Diaminobenzin
DN	dominant negative Variante
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dp	Dimerisations-Partnerprotein
e2f	E2-Promotor-bindender-Faktor
FCD	funktionelle kapilläre Dichte
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
gfp	<i>green-fluorescent-protein</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
Mean	Mittelwert
pc	cytomegalieviruspromotorbasiert
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
pecam	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
pRB	Retinoblastomtumorsuppressorprotein
rFCD	relative funktionelle kapilläre Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rVTA	relative vaskularisierte Tumorfläche
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
sh	<i>short-hairpin</i>
shRNA	short-hairpin-RNA
TA	Tumorfläche
vegf	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vegfr	vegf-Rezeptor
VTA	vaskularisierte Tumorfläche

1. Einleitung

1.1 Tumorbiologie

1.1.1 Wachstum und Progression

Neoplastische Erkrankungen weisen eine sehr hohe Diversität auf. Trotz der hohen Variabilität von Krebserkrankungen lassen sich doch einige Gemeinsamkeiten festmachen, die auf einen Großteil der uns bekannten Neoplasien zutreffen. Unser derzeitiges Verständnis von tumorösen Neubildungen basiert auf acht Fähigkeiten, die Zellen in ihrer Entwicklung von einer normalen Zelle zu einer malignen Zelle erlangen. Hanahan und Weinberg formulierten 2000 (Hanahan und Weinberg 2000) zunächst sechs *Hallmarks of Cancer* und erweiterten diese 2011 (Hanahan und Weinberg 2011) auf mindestens acht Eigenschaften, die im Verlauf der Tumorphagenese Schritt für Schritt von aberranten Zellen erlangt werden können, um schließlich ein komplexes Tumorgewebe mit heterotypen Wechselwirkungen in einem Tumormikromilieu zu bilden. Kurz zusammengefasst verfügen maligne Tumore und ihre Zellen über chronisch deregulierte Wachstumssignale, mangelnde Wachstumshemmung, erhöhte Apoptoseresistenz, replikative Unsterblichkeit, die Fähigkeit der Gefäßneubildung, der Gewebeinvasion und Metastasierung sowie über einen deregulierten Energiehaushalt und Möglichkeiten dem Immunsystem zu entkommen. Begünstigend für die Tumorprogression kommen noch die geminderte Genomstabilität und die tumorbegleitende Entzündungsreaktion hinzu. Mit dieser Klaviatur von Eigenschaften bilden sich im Verlauf der Progression Tumorgewebe aus malignen Zellen verschiedener Entartungsstufen und normalen Bindegewebszellen, wie Endothelzellen, Perizyten, Fibroblasten, deren Stammzellen sowie Immunzellen, die nun in diesem Kontext aktiv an der Aufrechterhaltung des Tumormilieus beteiligt sind. In unserem heutigen Verständnis steht also die Tumorzelle nicht mehr alleine, sondern vielmehr als unkontrollierter Dirigent in einem professionellen Orchester aus gesunden Zellen. Ein näheres Verständnis dieser Interaktionen zwischen gesunden Körperzellen und bösartig veränderten Zellen stellt daher eine wichtige Komponente des Verständnisses der Tumorbiologie dar (siehe Abb. 1, S.6).



Abb. 1: Die *Hallmarks of Cancer*, die Eigenschaften, die maligne entartete Zellen kennzeichnen, beeinflussen gemeinsam das gesamte Tumormilieu (im Zentrum dargestellt), bestehend aus Tumorzellen verschiedener Entartungsstufen und gesunden Körperzellen. Im Uhrzeigersinn von Zwölfrposition: mangelnde Wachstumshemmung, Immunevasion, replikative Unsterblichkeit, tumorbegleitende Entzündungsreaktion, Gewebeinvasion und Metastasierung, Gefäßneubildung, Genominstabilität, Apoptoseresistenz, deregulierter Energiehaushalt, Selbstunterhalt von Wachstumssignalen, aus Hanahan und Weinberg 2011.

1.1.2 Tumor- und Neoangiogenese

Die Fähigkeit zur Gefäßneubildung, die Angiogenese, ist für den menschlichen Organismus essentiell. Nicht nur bei physiologischen Prozessen wie der Wundheilung, der Plazentation, dem Menstruationszyklus sowie der embryonalen Entwicklung spielt sie eine zentrale Rolle, sondern auch bei einer Vielzahl von ischämischen, entzündlichen und neoplastischen Krankheiten (Yoo und Kwon 2013). Beim erwachsenen Organismus wird auch von „Neoangiogenese“ oder „Neovaskularisierung“ gesprochen. Diese geht von bereits bestehenden Gefäßen, genauer den postkapillären Venolen, aus (Carmeliet 2000). Die Neoangiogenese ermöglicht es dem Tumor durch Verkürzung von Diffusionsstrecken und verstärkte Durchblutung seinen erhöhten Stoffwechselumsatz auch bei Größen von mehr als 1-2 mm im Durchmesser zu erhalten. Kleinere Mikrotumore benötigen zum Überleben in der Regel keine eigene Gefäßversorgung, da die kritische Diffusionstrecke für Stoffwechselprodukte nicht überschritten wird (Folkman 1971; Fiedler et al. 2001; Li et al. 2012). Tumore die nicht in der Lage sind neue Gefäße zu initiieren, bleiben in ihrer Größe beschränkt und nehmen einen *dormanten*, schlafenden Zustand ein. Diese Ruhephase kann mehrere Jahre andauern (Gimbrone et al. 1972; Naumov et al. 2008). Darüber hinaus bilden Blut- und Lymphgefäße die Basis für die Abwanderung von malignen Zellen von ihrem Ursprungsort und damit auch die Metastasierung (Zetter 1998; Talmadge und Fidler 2010). Es überrascht daher nicht, dass Tumore ohne

Neoangiogenese meist lokal beschränkt bleiben und auf Grund ihrer geringen Größe auch klinisch kaum in Erscheinung treten (Naumov et al. 2008).

Dies ändert sich, sobald der sog. *Angiogenic Switch*, der Angiogeneseschalter, umgelegt wird. Dem Begriff liegt die Vorstellung zugrunde, dass die Angiogenese im gesunden Gewebe von einer Vielzahl proangiogener und angiostatischer Signale streng reguliert wird. Beim Gesunden wirken diese Signale homöostatisch und die bestehenden Gefäße sind stabil. Während der Tumorigenese vom normalen Gewebe über die verschiedenen Vorstufen bis zum malignen Tumor kippt dieses Gleichgewicht schließlich zu Gunsten der angiogenen Signale und ermöglicht dadurch exponentielles Tumorwachstum (Hanahan und Folkman 1996; Li et al. 2011) (siehe Abb. 2, S.7). Ist der Angiogeneseschalter einmal umgelegt, können auch Mikrotumore eine Neoangiogenese initiieren (Vajkoczy et al. 2002). Es ist also nicht die Größe des Tumors und die damit verbundene Hypoxie und Minderversorgung, sondern vielmehr dessen genetische Ausstattung dafür verantwortlich, dass sich neue Blutgefäße bilden und der Tumor das invasive Stadium erreicht.

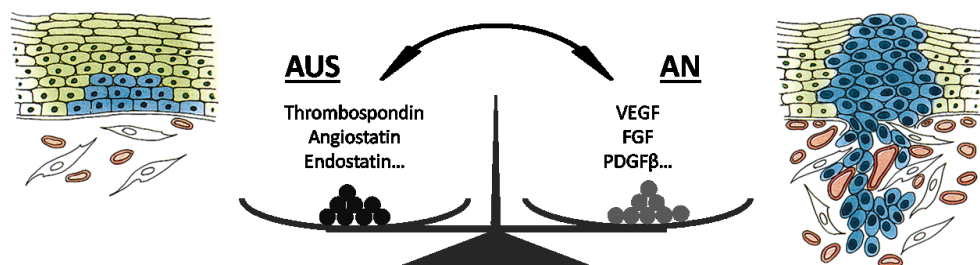


Abb. 2: Der *Angiogenic Switch*, der Angiogeneseschalter verdeutlicht das Konzept der Angiogeneseregulation. Angiogenese fördernde und hemmende Signale wirken gleichzeitig in einem Gewebe. Ob es zur Gefäßneubildung kommt, hängt von der überwiegenden Seite ab. Haben Tumore die passende genetische Ausstattung erlangt, können sie Dank der nun „angeschalteten“ Neoangiogenese den dormanten Zustand verlassen und vom Stadium eines *Carcinoma in situ* (links) in die invasive Form (rechts) wechseln und auch metastasieren, nach Hanahan und Folkman 1996.

Das erste Modell für den Ablauf der Tumorgefäßnetzbildung kam 1977 von Ausprunk und Folkman (Ausprunk und Folkman 1977). Zunächst werden durch angiogene Wachstumsfaktoren, die vom Tumor ausgehen, Endothelzellen aktiviert. Hierdurch kommt es zur Vasodilatation, Fenestration der Gefäßwand, Umverteilung von Adhäsionsmolekülen wie PECAM-1 und VE-Cadherin auf den Endothelzellen und zur Freisetzung verschiedener Proteasen wie Matrixmetalloproteasen und Plasminogenaktivatoren, die unter anderem die Basalmembran und Extrazellulärschicht auflösen. Durch die Proteolyse werden zusätzlich Zytokine freigesetzt und aktiviert,

darunter Angiostatin, Thrombospondin und Endostatin, die mit an der Regulation des Gefäßwachstums beteiligt sind. Die nun erhöhte Permeabilität der sonst dichten Gefäßwand ermöglicht den Übertritt von Blutbestandteilen in das umgebende Gewebe. Verbunden damit kommt es auch zur Migration von Endothelzellen, die zunächst solide Zellstränge bilden um schließlich ein eingeschlossenes Lumen zu formen, welches nun durchblutet werden kann. Diese rudimentären Mikrogefäße erfahren im weiteren Verlauf eine Stabilisierung, Differenzierung und auch Umbauvorgänge, *Remodeling*, um den lokalen Anforderungen gerecht zu werden. Hierzu gehören das Einwandern von Perizyten, das Ausbilden einer neuen Basalmembran, sowie das Schließen von interzellulären Lücken der Endothelzellen (Carmeliet 2000; Yoo und Kwon 2013) (siehe auch Abb. 3, S.8). Dieser mehrschrittige Vorgang wird als endotheliales Sprossen bezeichnet und ist nur eine von vielen Möglichkeiten, wie ein Tumor den angiogenen Phänotyp erreichen kann (Döme et al. 2007). Alternativen zur endothelialen Sprossung sind die Kooption von präexistenten Mikrogefäßen vor allem in bereits stark vaskularisierten Geweben (Holash 1999), das intussuszeptive Mikrogefäßwachstum bei dem bestehende Gefäße geteilt werden (Kurz et al. 2003), die postnatale Vaskulogenese mit Hilfe von zirkulierenden endothelialen Vorgängerzellen (Asahara et al. 1999; Ahn und Brown 2009), die glomeruläre Angiogenese und schließlich die Bildung von Gefäßen allein durch die Tumorzellen, als vaskulogene Mimikry bekannt (Maniotis et al. 1999; Folberg et al. 2000).

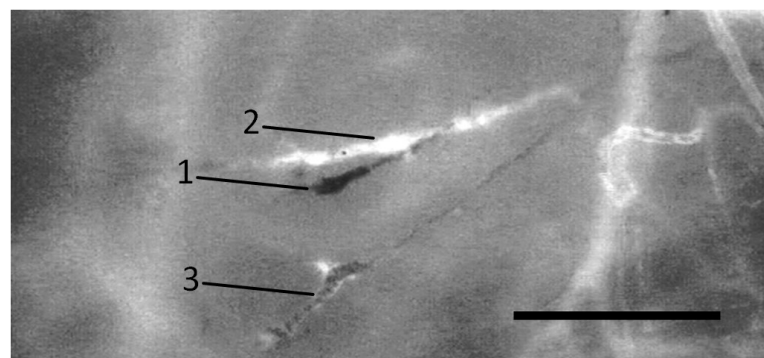


Abb. 3: Gefäßsprossung: Intravitalmikroskopische Aufnahme eines noch nicht funktionellen Gefäßsprosses (1), eines fast ausschließlich von Plasma durchflossenen Mikrogefäßes (2) und eines von Plasma und zellulären Blutbestandteilen durchströmten Mikrogefäßes (3). Das Plasma wurde mit Fluoreszeinisothiocyanat-gekoppeltem Dextran (FITC-Dextran, MW 150 kDa, 2 %, Exzitation_{max}/Emission_{max} λ : 490 nm/520 nm) in Blaulichtepiillumination (λ : 450-490 nm) sichtbar gemacht. Zelluläre Blutbestandteile, hauptsächlich Erythrozyten, sind somit dunkel kontrastiert und lassen den jeweiligen Hämatokrit in den Mikrogefäßen erkennen, Eichstrich 100 μ m.

Bei dieser Vielzahl von Angiogenesemechanismen erscheint es plausibel, dass sich das Tumorgefäßnetz im Verlauf einer Tumorerkrankung ständig wandeln und unterschiedliche Eigenschaften ausprägen kann. „Das Tumorgefäß“ gibt es nicht (Sitohy et al. 2012). Bei Betrachtung der ausgeprägten Wandlungsfähigkeit von malignen Tumoren und deren Blutgefäßen überrascht die ungeordnete Architektur, die oft mangelhafte Funktionalität und Fragilität von Tumorgefäßnetzen nicht. Typische Tumormikrogefäße verfügen über keine klare Differenzierung, sondern weisen einen unregelmäßigen Verlauf mit stark variierenden Aufgabelungsmustern, schwankenden Gefäßdiametern, unterschiedlich durchbluteten Bereichen mit jeweils eigenem Hämatokrit und somit auch unterschiedlichen rheologischen Eigenschaften auf (siehe auch Abb. 3, S.8 und Abb. 11, S.28) (Leunig et al. 1992; Vajkoczy et al. 2002; Eichhorn et al. 2007).

1.2 Tumorthherapie

1.2.1 Allgemeine Therapien

In der modernen Medizin gehören Krebserkrankungen neben Herz-/Kreislauferkrankungen und Infektionserkrankungen nach wie vor zu den größten Herausforderungen sowohl für die Behandelnden als auch die Betroffenen. Neoplastische Erkrankungen sind auf Grund ihrer steigenden Inzidenz, der mit ihnen verbundenen Morbidität und Mortalität und unseres lückenhaften Verständnisses dieses Krankheitskomplexes von hoher Brisanz. Durch jahrtausendelange Forschung seit Hippocrates, Celsus und Galen wurden wesentliche Fortschritte erzielt, die gleichwohl nur einen kleinen Einblick in die extrem variationsreiche Tumorbilogie bieten können. Während Tumore etwa 4000 Jahre fast ausschließlich chirurgisch behandelt werden konnten, hat die technische und biomedizinische Entwicklung der letzten Jahrzehnte unsere Möglichkeiten der Bekämpfung und auch Heilung von *Carcinomata* deutlich erweitert (Hajdu 2011a, 2011b). Mit der ersten erfolgreichen Äthernarkose 1846 durch Horton und der weiteren Entwicklung moderner Narkoseverfahren konnte die Chirurgie wesentlich verfeinert werden. So legten Billroth, Handley und Halsted die Grundsteine der heutigen operativen Tumorthherapie, Rudolf Virchow hingegen eröffnete das Gebiet der Zellpathologie. Während des Zweiten Weltkrieges wurde mit der Entdeckung von zytostatischen Eigenschaften eines Senfgasabkömmlings die Entwicklung des auch heute weithin genutzten Methotrexats angestoßen und damit die systemische Chemotherapie eingeleitet. Heute werden Krebspatienten nach klinischen Standards therapiert, die auf einer Vielzahl klinischer Studien beruhen. Zu den festen Säulen der Tumorthherapie gehören neben der Chirurgie,

der Chemotherapie und der Radiotherapie heute auch die Stammzelltransplantation, Hormontherapie, photodynamische Therapie, Hyperthermie, Immuntherapie und die *Targeted Therapy* (American Cancer Society 2012). Die meisten Therapieformen beeinträchtigen und schädigen jedoch den gesamten Organismus. Sie weisen massive unerwünschte Wirkungen auf, die oft therapielimitierend sind (Epstein et al. 2012; Prezioso und Tanzi 2010). So ist die Angst vor unheilbaren und tödlichen Krebserkrankungen nach wie vor begründet, auch wenn die Fortschritte der Onkologie inzwischen vielen Patienten eine jahrelange Kontrolle oder gar Heilung ihrer Krebserkrankung ermöglichen.

1.2.2 *Targeted Therapy*

Die klassische Chemotherapie beruht auf der Wirkung von Zytostatika. Der therapeutische Ansatz ist hier, dass schnell wachsende Tumore besonders anfällig gegenüber Störungen im Prozess der Zellteilung und des Zellstoffwechsels sind. Methotrexat, ein Folsäureantagonist, war das erste klinisch erfolgreiche Zytostatikum. Die Substanz kam 1949 auf rein empirischer Basis zum Einsatz, ohne dass die Struktur der DNA (Schoch et al. 2014), geschweige denn der Ablauf ihrer Synthese und Replikation bekannt war. Auch andere Zytostatika mit Wirksamkeit bei verschiedenen Tumorentitäten wurden durch empirisches Vorgehen bzw. Beobachtung entdeckt. Die klassische Chemotherapie stellt eine Breitbandtherapie dar, die auch gesunde Zellen beeinträchtigt, da sie fundamentale Mechanismen stört, die für alle Zellen essentiell sind. Mit der Entdeckung von tumorspezifischen Biomarkern entstand die Idee einer molekular gezielten Therapie, die sich selektiv gegen Tumorzellen und deren Mikromilieu richtet (Klener, JR. und Klener 2012; Sounni und Noel 2013). Prototypen dieser Herangehensweise sind der CD-20-Antikörper Rituximab zur Therapie von malignen B-Zelllymphomen (Cang et al. 2012) und der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib, der den überaktiven bcr-abl-Tyrosinkinase-Signalweg hemmt (Sacha 2013). Durch diese molekulare Selektivität ist nicht nur das Wirkspektrum auf ganz bestimmte Tumortypen eingeschränkt, sondern auch das Potential unerwünschter Wirkungen. Basis für die Entwicklung solch gezielter Tumorthérapien bleibt die Grundlagenforschung, die immer neue Erkenntnisse über die Tumorbilogie erlangt (Klener, JR. und Klener 2012). Auch relativ junge Gebiete wie die Nanotechnologie (Grimm und Scheinberg 2011), Gentherapie (Cross und Burmester 2006) und die Immunotherapie (Khalil et al. 2016) beteiligen sich mit vielversprechenden präklinischen Erfolgen und

inzwischen auch einigen klinischen Anwendungen an der Erweiterung der Möglichkeiten der *Targeted Therapy*.

1.2.3 Anti-angiogene Therapien

Judah Folkman betrachtete in den 1970ern die Angiogenese als die mögliche Achillessehne von Tumoren und schlug die Inhibition der Neoangiogenese als neue Strategie in der Krebstherapie vor (Folkman 1971). Obwohl die Hypothese, dass Tumore auf die Neoangiogenese angewiesen sind, inzwischen akzeptiert ist, folgte einer großen Euphorie inzwischen bei der klinischen Anwendung Ernüchterung. So brachten die bisher eingeführten Therapiestrategien nicht den erhofft durchschlagenden Erfolg, sondern es zeigen sich nach zunächst deutlichem Ansprechen Resistenzen gegen die Therapien und die erneute Progression der Krebserkrankungen (Dey et al. 2015). Insgesamt ließen sich im Vergleich mit den konventionellen Therapien meist nur geringe Vorteile für die Patienten erreichen (Abdollahi und Folkman 2010; Sitohy et al. 2012; Palamaro et al. 2014). Auch ist die antiangiogene Therapie mit unerwünschten Wirkungen behaftet. Dazu gehören neben der erwarteten verzögerten Wundheilung, die arterielle Hypertonie, glomeruläre Störungen mit Anasarka, Herzinsuffizienz, Neigung zu lebensbedrohlichen Hämorrhagien und Anämie (Mecklenburg et al. 2005; Young und Reed 2012). Nichtsdestotrotz sind antiangiogene Therapeutika wie der *vascular endothelial growth factor*/vegf-Antikörper Bevacizumab und Tyrosinkinaseinhibitoren wie Sunitinib und Sorafenib in der klinischen Anwendung im Rahmen von Kombinationsschemata etabliert (Young und Reed 2012; Kong et al. 2017). Argumente gegen antiangiogene Therapien werden schon lange diskutiert, da eine vaskuläre Minderversorgung der Karzinome auch nachteilig für die Patienten sein kann. So ist die Effektivität der Radiotherapie auch von der Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes abhängig, Chemotherapeutika sind auf die Durchblutung der Tumore angewiesen, um an ihren Wirkort zu gelangen und die erzeugte Hypoxie und die damit verbundene Azidose können zur Selektion aggressiver Zellklone im Tumorgewebe führen und so die Progression begünstigen (Abdollahi und Folkman 2010; Reth 1995). Insgesamt zeigen antiangiogene Therapieregime in Kombination mit Radio- und Chemotherapie vor allem bei fortgeschrittenen soliden Tumoren eine, wenn auch geringe, Synergie in Hinblick auf Überlebensdauer und progressionsfreies Überleben (Samant und Shevde 2011). Carmeliet und Jain stellten 2005 eine Erklärung für diese Ambivalenz der antiangiogenen Therapie vor, welche die, bis zu diesem Zeitpunkt erlangten, klinischen Erfahrungen

aufgreift (Carmeliet und Jain 2011). Diese gehen davon aus, dass die Tumorgefäßarchitektur so anormal und in ihrer Funktion eingeschränkt ist, dass die Voraussetzungen für eine Chemo- und Radiotherapie suboptimal sind. Im Tumorgewebe herrscht durch undichte Kapillaren, unkontrollierte Proliferation und mangelhafte Versorgung mit ableitenden Lymphgefäßen ein erhöhter Gewebedruck, der zur Kompression der Tumormikrogefäße führt, wodurch das Tumorgewebe ungleichmäßig durchblutet wird. Optimal für die Applikation von Chemotherapeutika und Radiotherapie wäre demnach eine Normalisierung der Tumorgefäßarchitektur, die eine gleichmäßige Verteilung der Therapeutika und Sauerstoff im gesamten Tumorgewebe ermöglichen würde. Erste Versuche konnten diesen Effekt bereits nachweisen (Leuci et al. 2016; Kim et al. 2017). Die klinische Herausforderung besteht folglich in der richtigen Kombination synergistisch wirkender Therapeutika, der richtigen Applikationssequenz und der optimalen Dosierung. So könnte sich die Normalisierung des Tumorgefäßnetzes erreichen lassen, ohne das physiologische Gewebe nachhaltig zu schädigen (Samant und Shevde 2011; Reth 1995). Eine zusätzliche Herausforderung in der antiangiogenen Therapie ist das komplexe Regulationsnetzwerk der Tumorgefäßhomöostase, das von starken Redundanzen geprägt ist. Deshalb reicht die Ausschaltung eines proangiogenen Signals oftmals nicht aus, um das Tumorgefäßnetzwerk nachhaltig zu beeinträchtigen. Auch sprechen verschiedene Tumorgefäßtypen auf antiangiogene Therapeutika unterschiedlich und manchmal auch gar nicht an (Sitohy et al. 2012). Deshalb erscheint es sinnvoll mehrere antiangiogen wirkende Therapeutika miteinander zu kombinieren, um das proangiogene Netzwerk zu durchbrechen (Quesada et al. 2007; Montañez et al. 2011).

1.3 E2F-Familie

1.3.1 e2f-Transkriptionsfaktoren

1987 stellten Kovesdi und Kollegen ein Protein vor, welches in eukaryoten Zellen die durch E1A vermittelte Transkription des adenoviralen E2 Genes durch Bindung an dessen Promotor ermöglicht. Sie nannten das Molekül E2-Promotor-bindenden-Faktor oder kurz e2f (Kovesdi et al. 1987). Das Bindemotiv im E2 Promotor, die Basensequenz „TTTCGCGC“ ist auch in Promotoren von Zellzyklus sowie Apoptose regulierenden Genen konserviert. So zählen unter anderen Zyklin E, Zyklin A, Zyklin D1, die Dihydrofolatreduktase, die DNA-Polymerase α , APAF1 und P53 zu Zielgenen von e2f

(Stevens und La Thangue 2003). Das Interesse vieler Forscher wurde geweckt, als bekannt wurde, dass e2f seinerseits durch das Retinoblastomtumorsuppressorprotein (pRB), ein sog. Pocket-Protein, reguliert wird (Nevins 1992). e2f erfüllt zentrale Funktionen bei der Zellzyklusregulation sowie der Apoptose (Polager und Ginsberg 2009). Inzwischen wurden durch *in vitro* Studien acht Vertreter der e2f-Familie (e2f1 bis e2f8) mit mannigfaltigen Funktionen und Eigenschaften identifiziert und der pRB/e2f-Signalweg genauer ausformuliert. Die e2f-Transkriptionsfaktoren werden kanonisch in Aktivatoren (e2f1-e2f3a) und Repressoren (e2f3b bis e2f8) der e2f-Zielgene unterteilt. e2f1 bis e2f6 bilden Heterodimere mit Dimerisations-Partnerproteinen (dp-1 bis dp-4), wobei die verschiedenen möglichen Paarungen unterschiedliche, teilweise sich überlappende Funktionen wahrnehmen können (Trimarchi und Lees 2002). e2f1 bis e2f5 werden durch pRB und die strukturverwandten Pocket-Proteine p107 und p130 reguliert, die diese im hypophosphorylierten Zustand binden, deren Transaktivierungsdomänen verdecken und so die Bindung an die Zielpromotoren verhindern. Die Mitglieder der e2f-Familie weisen unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Pocket-Proteinen auf. Die Aktivatoren e2f1-e2f3 binden vor allem an pRB, wohingegen e2f4 mit allen drei Proteinen interagiert, e2f5 fast ausschließlich p130 bindet und e2f6, e2f7 und e2f8 unabhängig von den Pocket-Proteinen arbeiten (Dyson 1998; Stanalle und Pützer 2006; Chen et al. 2009).

Wird eine Zelle durch Wachstumssignale angeregt, so steigt in der frühen G1-Phase die Konzentration der Zykline d1-d3. Dies führt durch Komplexbildung mit den zyklinabhängigen Kinasen (cdk) 4 und 6 zu deren Aktivierung, welche nun die Pocket-Proteine (pRB, p107, p130) phosphorylieren und e2f1 aus den Heterodimeren freisetzen. Hierdurch wird Zyklin E vermehrt gebildet, welches nun zusammen mit cdk2 in einem positiven Feedbackloop die Phosphorylierung der Pocket-Proteine unterstützt und die Freisetzung von e2f verstärkt. Dadurch werden die e2f-Zielgene zunehmend aktiviert und die Zelle überschreitet schließlich den Restriktionspunkt und tritt in die S-Phase des Zellzyklus ein. cdk-Inhibitoren (cdki) wie die verschiedenen ink4-Moleküle (*inhibitors of cdk4*, p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c}, p19^{Ink4d}) und cip/kip (*kinase inhibiting proteins*, p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}) wirken diesen Prozessen entgegen und können bei Wachstumshemmung oder DNA-Schädigung die G1/S-Transition blockieren (Stevens und La Thangue 2003; Chen et al. 2009; Xanthoulis 2013) (siehe Abb. 4, S.14).

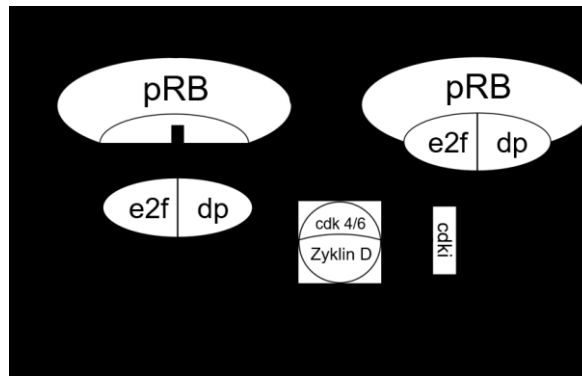


Abb. 4: Schematische Darstellung des pRB/e2f-Signalwegs: der pRB/e2f-Signalweg vermittelt unter anderem die Transition der Zelle aus der G₁- in die S-Phase. Das Heterodimer aus e2f und einem Protein der dp-Familie ist in der frühen G₁-Phase an pRB gebunden und somit inaktiv. Auf Wachstumsreize hin wird pRB von cdk 4/6 (cdki-reguliert), welche Komplexe mit Zyklin D bilden, hyperphosphoryliert und gibt so e2f/dp frei, welches nun an seine Zielpromoter bindet. Dadurch werden Proteine gebildet, die das Überschreiten des Restriktionspunkts des Zellzyklus ermöglichen. Die Deregulierung eines oder mehrerer der beteiligten Proteine kann zu unkontrollierter Proliferation der betroffenen Zelle führen (Stevens und La Thangue 2003).

Wird diese zentrale Regulation gestört, kann der Zellzyklus leicht außer Kontrolle geraten. Dies kann z.B. durch den Befall mit onkogenen Viren verursacht werden, die Karzinome initiieren. In entarteten Zellen wird häufig eine verstärkte e2f-Aktivität gefunden. Nur selten ist E2F selbst verändert. Meist sind Mitglieder in dessen Signalweg betroffen. Beschrieben sind die Überexpression von Zyklin D1, Defekte von ink4, Strukturdefekte von cdk4 mit herabgesetzter cdk-i-Affinität und pRB-Defekte (Stevens und La Thangue 2003). Neben der Regulierung des Zellzyklus ist e2f auch in der Lage, bei DNA-Schädigung die Apoptose von Zellen einzuleiten und wirkt dadurch als Tumorsuppressor. Wie e2f *in vivo* wirkt, ob als Tumorpromotor oder -suppressor, scheint in hohem Maß von dem Kontext und dem jeweiligen Status von e2f abhängig zu sein. Die Expression von E2F ist in verschiedenen Tumorentitäten extrem heterogen, was den ganz unterschiedlichen Einfluss von e2f auf die Prognose des Patienten begründet. Aus den in Zellkulturexperimenten gewonnenen Erkenntnissen über e2f lässt sich deren intravitalen Verhalten nur schlecht vorhersagen. Grund hierfür sind vermutlich die komplex vernetzten Regulationsmechanismen, die funktionellen Antagonismen, sowie die hohe Redundanz der verschiedenen e2f-Varianten (Xanthoulis 2013).

1.3.2 E2F1

e2f1 ist das am besten untersuchte Mitglied der e2f-Familie. Es steht nicht nur als Aktivator im Zentrum des pRB/e2f-Signalweges und somit der Zellzykluskontrolle, sondern spielt auch eine wichtige Rolle als Tumorsuppressor (Yamasaki et al. 1996), indem es die Apoptose oder einen Zyklusarrest nach DNA-Schädigung in Gang setzen kann (Stanelle und Pützer 2006). Zentrale Apoptoseinduktoren wie P53, P73, APAF1 und verschiedene Caspasen (2, 3, 7, 8, 9) (Nahle et al. 2002) sind Zielgene von e2f1. Moleküle wie atm, *ATM-and-Rad3-related protein*/atr, chk1 und chk2, die DNA-Schäden detektieren, können e2f1 phosphorylieren und dadurch stabilisieren. Des Weiteren verhindert das Phosphoserin-bindende-Protein 14-3-3 τ bei DNA-Schädigung die Ubiquitinierung und damit den Abbau von e2f1. In der G1-Phase des Zellzyklus ist e2f1 zunächst an pRB gebunden, kann jedoch auch in dieser Phase die Apoptose aktivieren und so bei Störungen der Zellphysiologie den Übergang in die S-Phase verhindern. pRB besitzt eine C-terminale Domäne, die speziell die apoptoseinduzierende Region von e2f1 bindet. Bei DNA-Schädigung wird dieser Bereich acetyliert und dadurch e2f1 freigesetzt, ohne die Bindung der anderen e2fs zu beeinflussen (Engelmann und Pützer 2010).

In weit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen sind jedoch dem e2f1 nachgeschaltete Signalwege der Apoptose häufig gestört, so dass die Suppressorfunktion des e2f1 umgangen wird. Dann gelangen tumorfördernde Eigenschaften von e2f1 in den Vordergrund. So steht eine starke E2F1-Expression auch mit der Invasivität von Blasentumoren in Verbindung (Lee et al. 2010). Ebenso ist die Überexpression von E2F1 mit schlechtem Überleben, Metastasierung und auch Chemoresistenz assoziiert (Han et al. 2003; Imai et al. 2004; Alla et al. 2010). Im malignen Melanom fördert e2f1 über die Induktion von EGFR die Progression von schwach metastasierenden Tumorzellen zu stark metastasierenden Zellen mit stärkerem pulmonalen Metastasenwachstum (Alla et al. 2010). Bei Prostatakarzinomen steigert e2f1 die Expression des Androgenrezeptors, welcher in der Pathogenese dieser Tumorentität essentiell ist (Sharma et al. 2010). e2f1 wird inzwischen auch mit Mechanismen der Chemoresistenz in Verbindung gebracht. Anthracycline wie Doxorubicin oder Daunorubicin aktivieren e2f1, welches seinerseits an den Promotor des mutierten P53 (TP53) bindet. Dieser wird dadurch effizient induziert, so dass tp53 akkumuliert. Diese Akkumulation verstärkt die Chemoresistenz und die Fähigkeit zur Metastasierung der aberranten Zellen (Bug und Dobbstein 2011; Engelmann und Pützer 2012). Weitere Beispiele des prognoseverschlechternden Einflusses von e2f1 finden sich

bei Adenokarzinomen des Pankreas, den squamösen Oesophaguskarzinomen, den nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen oder den Mammakarzinomen (Xanthoulis 2013). e2f1 ist also in seiner Funktion sehr ambivalent und stark abhängig vom zellulären Kontext.

1.4 Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren

1.4.1 vegf und ihre Rezeptoren

vegf sind Wachstumsfaktoren bei Säugetieren. Seit der Entdeckung eines vpf/*vascular permeability factor* durch Senger 1983 (Paddison et al. 2002) und eines vegf/*vascular endothelial growth factor* durch Ferrara und Henzel 1989 (Kirkin et al. 2004), welche sich später als identisch herausstellten, wurden fünf verschiedene vegf-Isoformen, vegf-a, vegf-b, vegf-c, vegf-d und plgf/*placental growth factor*, identifiziert (Mecklenburg et al. 2005). Daneben wurden auch nicht humane strukturverwandte Peptide vegf-e (Parapoxvirus) und vegf-f (Schlangengift) gefunden (Koch et al. 2011). Beim Menschen finden sich drei homologe Rezeptoren vegfr-1, vegfr-2 und vegfr-3 sowie eine lösliche Variante von vegfr-1, svegfr-1. Zebrafärblinge/*Danio rerio* besitzen vier sehr ähnliche Gene, welche daher oft als Synonyme verwendet werden: flt-1/*fms-like tyrosine kinase-1* (VEGFR-1), kdr/*kinase insert domain receptor* und kdr-like (VEGFR-2) sowie flt-4 (VEGFR-3). Die membrangebundenen meist homodimeren Rezeptoren sind stets ähnlich aufgebaut. Sie bestehen aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne, welche aus sieben Immunglobulin-ähnlichen Schleifen aufgebaut ist und für die Ligandenbindung zuständig ist, einer transmembranären und einer juxtamembranären Domäne, zwei intrazellulären Domänen mit Tyrosinkinaseaktivität, sowie dem intrazellulären C-terminalen Ende. Wie für Tyrosinkinase Rezeptoren typisch, erfolgt die Signaltransduktion nach Ligandenbindung und Dimerisation über eine Konformationsänderung der Tyrosinkinasedomänen. Durch diese Konformationsänderung werden die ATP-Bindungsstellen der Tyrosinkinasedomänen freigelegt und sowohl Autophosphorylierung als auch Phosphorylierung von SH2/*Src-homology 2*-Domänen in anderen Signaltransduktions-Proteinen ermöglicht (Koch et al. 2011). vegfr-1 bindet plgf, vegf-a und vegf-b, vegfr-2 bindet vegf-a und vegf-c sowie vegf-d, vegfr-3 bindet vegf-c und vegf-d als Liganden (Asahara et al. 1999). Die Affinitäten der Partner zueinander sind unterschiedlich und können durch weitere Bindungspartner wie die Neuropiline (npr-1, npr-2), Heparansulfat und Integrine verändert werden. vegf und ihre Rezeptoren spielen in der

embryonalen und fetalen Entwicklung, dem physiologischen Wachstum und der Regulation verschiedenster Funktionen von Endothelzellen, bzw. von Blut- und Lymphgefäßen eine große Rolle. So wird VEGFR-1 unter anderen von Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen, VEGFR-2 von Endothelzellen und VEGFR-3 von lymphatischen Endothelzellen exprimiert. Am bedeutendsten ist wohl die Bindung von vegf-a an vegfr-2, welche nicht nur essentiell für die Gefäßentwicklung im embryonalen Stadium, sondern auch hauptverantwortlich für das Wachstum, die Migration und Permeabilität von Endothelzellen ist. Neben diesen physiologischen Funktionen sind vegf-Signalwege auch für pathologische Prozesse, wie die Förderung metastasierenden Tumorwachstums und der Tumorprogression, verantwortlich (Moore et al. 2010; Takahashi 2011). Viele Tumorzellen exprimieren neben verschiedenen VEGF auch deren Rezeptoren (Goel und Mercurio 2013). In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass VEGFR-1 und VEGFR-2 auch durch den pRB/e2f1-Signalweg reguliert werden (Mansoori et al. 2014). So beeinflussen die VEGFs, auch e2f1 reguliert, nicht nur parakrin das gesamte Tumormilieu und die Neoangiogenese, sondern auch über autokrine Stimulation der vegf-Rezeptoren die Tumorzellen selbst.

1.4.2 VEGFR-3

VEGFR-3 wird beim Erwachsenen vor allem auf lymphatischen Endothelzellen exprimiert und fördert dort unter anderem über die *jnk/c-jun N-terminal-kinase*, eine mitogenaktivierte Kinase (MAP-Kinase), das Überleben dieser Zellen. *vegfr-3* reguliert ebenfalls *erk/extracellular signal regulated kinase 1* und *2*, zwei weitere MAP-Kinasen und Phosphoinosit-3-Kinasen und unterstützt so die Entwicklung von Lymphgefäßen durch gesteigerte Migration von lymphangiogenen Zellen. Die Expression von VEGFR-3 ist vom Entwicklungsstadium des Organismus abhängig. So findet sich *vegfr-3* zunächst im gesamten primären vaskulären Plexus, dann im venösen Endothel des Herzens und schließlich nur noch in Lymphgefäßzellen und in aktivierten Endothelzellen (Koch et al. 2011). VEGFR-3 wird nicht nur im gesunden Gewebe exprimiert, sondern auch bei Adenokarzinomen der Lunge und des Kolorektums, verschiedenen Kopf-/Halstumoren, Mammakarzinomen, Prostatakarzinomen, Leukämiezellen und dem Kaposisarkom. Bei Tumoren fördert *vegfr-3* die Entwicklung von tumornahen Lymphgefäßen, welche die lymphogene Aussaat ermöglichen. Außerdem steigern *vegfr-3* vermittelte Signale die Invasivität und Migration der Tumorzellen und dadurch die Tumorprogression. In diesem

Zusammenhang ist vegf-c ein wichtiger Ligand von vegfr-3 (Su et al. 2006; Su et al. 2007; Chien et al. 2009; Kurenova et al. 2009).

1.5 Zielsetzung der Studie

Der Oberflächenrezeptor vegfr-3 und der Transkriptionsfaktor e2f1 werden als mögliche Promotoren von Tumorerkrankungen diskutiert. Sie können lohnende Ziele für eine *Targeted Therapy* darstellen. *In vitro* Versuche von Kollegen am Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung Rostock hatten ergeben, das e2f1, vermutlich vermittelt über den vegf-c/vegfr-3-Signalweg, die Neoangiogenese fördern kann (Engelmann et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit sollte der mögliche Zusammenhang von e2f1 und vegfr-3 im Tierversuch analysiert werden. In einem orthotopen Tumormodell sollte die Wirkung der beiden Faktoren auf die Bildung eines frühen funktionellen Tumormikrogefäßnetzwerkes untersucht werden. Dafür standen Vektoren zur Überexpression bzw. dem Knockdown der beiden Faktoren in humanen Melanomzelllinien zur Verfügung. Die Wirkung dieser Interventionen auf die Neoangiogenese der inokulierten Tumore sollte mit Intravitalmikroskopie qualitativ erfasst und auch quantifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden ausschließlich mit männlichen NMRI nu/nu, sogenannten athymischen Nacktmäusen (Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}), mit einem Alter zwischen 5 bis 10 Wochen und einem Körpergewicht von 25 g bis 30 g durchgeführt (n=58, siehe Abb. 8, S.23). Die verwendeten Tiere wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock gezüchtet und während des Versuchs in Einzelkäfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Standardpelletfutter in klimatisierten Räumen mit einem 12 Stunden Tag-Nachtrhythmus gehalten. Die Tierversuche waren gemäß Tierschutzgesetz §8 (LALLF M-V/TSD/7221.3-2.4-044/10) genehmigt und standen unter der Aufsicht des institutseigenen Tierschutzbeauftragten.

2.2 Tumorzellen

2.2.1 Zelllinien

Die behandelten Tumorzellen wurden vom Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt und für die Transplantation vorbereitet (Engelmann et al. 2013). Verwendung fanden amelanotische humane Melanomzellen (SK-Mel-29, SK-Mel-147). SK-Mel-29 Zellen verfügen über geringe endogene E2F1-Expression, wohingegen SK-Mel-147 Zellen über eine starke endogene E2F1-Expression verfügen (Alla et al. 2010; John et al. 2010).

2.2.2 Knockdown sowie Überexpression von E2F1

In die Tumorzellen wurden mit Hilfe verschiedener Plasmide Vektoren eingebracht um die Genexpression von E2F1 quantitativ zu verändern. Für den Knockdown von E2F1 wurden lentivirale Plasmide (pLK0.1-puro), die für *short-hairpin-RNA/shRNA*, sh.E2F1 (TRCN 250/sh.E2F1#1, TRCN 253/sh.E2F1#2; Sigma-Aldrich, Deutschland) codieren, in die Zellen integriert, siehe Abb. 6, S.21 und Alla et al. 2010. Für die Überexpression von E2F1 wurden für E2F1 codierende cytomegalieviruspromotorbasierte DNA Vektoren (pcDNA3.1-E2F1) in die Zellen eingebracht und mit 1 µM 4OH-Tamoxifen aktiviert (Alla et al. 2010).

An die E2F1-Überexpression war ebenso die Expression von *green-fluorescent-protein/gfp*, ein in Säugetieren nicht natürlich vorkommendes grün fluoreszierendes Protein, gekoppelt. So ließ sich die Überexpression auch fluoreszenzmikroskopisch nachweisen (Engelmann et al. 2013). Als Kontrollbehandlung zum E2F1-Knockdown diente die Integration von lentiviralen Plasmiden, die für shRNA gegen GFP, sh.control (SHC002, Sigma-Aldrich, Deutschland) codieren und für die E2F1-Überexpression die Integration eines Leervektors (pcDNA3.1) (Alla et al. 2010). Zur Funktionsweise von shRNA siehe Abb. 5, S.20. Zur Effektivität des Knockdowns bzw. der Überexpression siehe Abb. 6, S.21 und Engelmann et al. 2013.

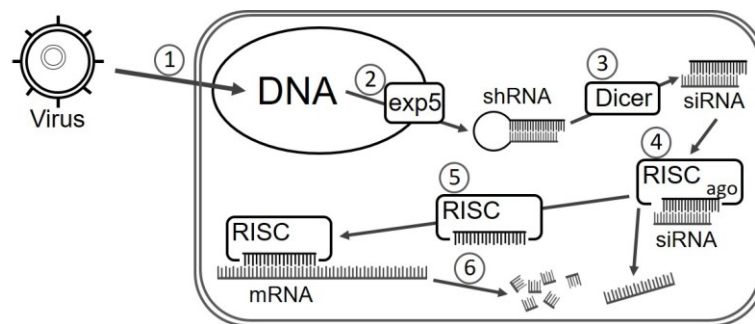


Abb. 5: Selektives Gen-Knockdown mittels RNA-Interferenz (RNAi) durch *Short-Hairpin*-RNA (shRNA). (1) Die Transfektion mit retroviralen Plasmiden integriert Vektoren stabil in die DNA der Zelle, welche diese Veränderungen so auch an die Tochtergenerationen weitergeben. (2) Die shRNA, oligonukleotidische Doppelstrang-RNA mit einem aus wenigen Nukleotiden bestehenden Loop, wird in den Zielzellen exprimiert und gelangt über Exportin 5 (exp5) in das Zytosol. (3) Dort wird die shRNA durch Dicer, ein RNase-III-Enzym, in doppelsträngige *small interfering* RNA (siRNA) mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden und symmetrischen 2-3 Nukleotid langen 3' Überhängen gespalten. (4) Diese Komplexe werden von RISC (RNA-induced silencing complex) aufgenommen und durch Argonaut 2 (ago), ein in RISC integriertes multifunktionales Protein, entwunden. (5) Der Sinnstrang verbleibt in RISC und vermittelt die komplementäre Bindung an die Messenger-RNA (mRNA) des Zielgens, (6) welche nun degradiert wird. So wird ein posttranskriptionales Gensilencing erreicht, welches dem zelleigenen Regulationsmechanismus durch Mikro-RNA (miRNA) sehr ähnlich ist, nach Sliva und Schnierle 2010.

2.2.3 VEGFR-3-Knockdown und Inaktivierung von vegfr-3

Für den Knockdown von VEGFR-3 wurde zum einen, wie im Fall von E2F1, lentivirale Plasmide mit für sh.VEGFR-3 codierende Vektoren in die Zellen eingebracht (Kurenova et al. 2009), und zum anderen komplementäre DNA (cDNA) einer dominant negativen Variante von VEGFR-3 (DN-VEGFR-3) in das Erbgut der Tumorzellen integriert. Die so durch rekombinante Expression entstehenden nicht funktionellen vegfr-3-Monomere

verhindern die Bildung funktioneller vegfr-3-Homodimere mit Tyrosinkinaseaktivität. Als Kontrollbehandlungen dienten sh.control (SHC002; Sigma-Aldrich, Deutschland) und die Integration von nicht codierender cDNA (DN-Empty) (Suzuki et al. 2005; Sapoznik et al. 2009; Flister et al. 2010). Alternativ wurde vegfr-3 durch den Tyrosinkinaseinhibitor MAZ51, der die Autophosphorylierung stört, chemisch inaktiviert (Kirkin et al. 2004; Engelmann et al. 2013). Zur Effektivität des Knockdowns bzw. der Überexpression siehe Abb. 6, S.21 und (Engelmann et al. 2013).

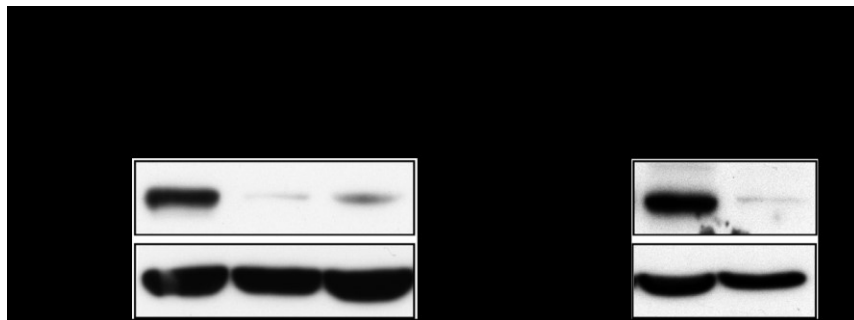


Abb. 6: Knockdown-Kontrolle: exemplarisch gezeigt werden zwei Western-Blots zur Verifizierung des Knockdowns von E2F1 (TRCN250/sh.E2F1#1, TRCN253/sh.E2F1#2; Sigma-Aldrich, Deutschland) bzw. VEGFR-3 durch RNAi mittels shRNA in SK-Mel-147. Als Kontroll-shRNA diente sh.control gegen GFP (SHC002, Sigma-Aldrich, Deutschland) und als Kontrolle im Western-Blot diente Aktin. Näheres ist (Engelmann et al. 2013) zu entnehmen.

2.3 Modell

2.3.1 Chirurgische Präparation der Rückenhautkammer

Die erste Präparation, die das intravitale Beobachten von Blutgefäßen und Zellen am lebenden Tier ermöglichte, wurde schon 1924 von Sandison (Sandison 1924) beschrieben. Hier wurde ein Deckglas unter die Haut eines Kaninchenohrs geschoben, ein Sichtfenster ausgeschnitten und das Deckglas befestigt. Nach vielfältiger Veränderung und Anpassung an unterschiedliche Tierarten (Algire 1943) wurde diese Methode 1993 schließlich durch Lehr et al. (Lehr et al. 1993) zur Anwendung an der Nacktmaus adaptiert.

Die Rückenhautkammer besteht hier aus zwei Titanrahmen, die eine Hautfalte am Rücken der Maus zwischen sich fassen. Die beiden Rahmen verfügen über je ein Sichtfenster mit einem Durchmesser von 12 mm, Bohrungen zur Nahtfixierung der Hautfalte sowie Bohrungen für Halteschrauben. Der rückseitige Rahmen trägt die Halteschrauben, auf die Sechskantmuttern als Abstandhalter der beiden Rahmen aufgeschraubt sind, um eine

ungehinderte Durchblutung der präparierten Hautfalte zu sichern. In die Sichtfenster sind Ringfassungen eingelassen, die zum einen den Abstand der beiden Rahmenöffnungen auf die einfache Hautdicke reduzieren, um die Präparation luftdicht zu verschließen und zum anderen das Fixieren eines Deckglases mit einem Sprengring ermöglichen. Die beiden Rahmen schließlich werden ebenfalls durch Sechskantmutter, die auf die überstehenden Halteschrauben aufgeschraubt werden, fest miteinander verbunden, Abb. 7, S.22.

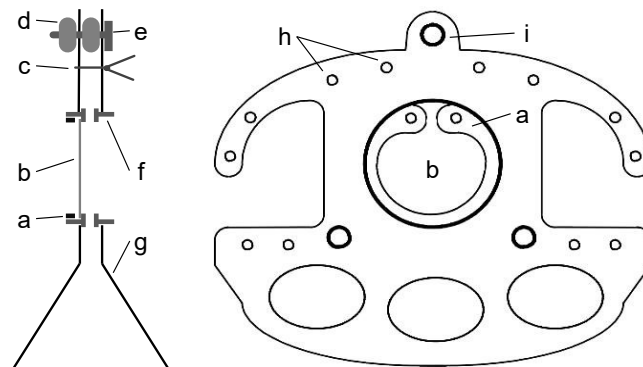


Abb. 7: Querschnitt (links) und Aufsicht (rechts) einer Rückenhautkammer, nach (Sckell und Leunig 2009).
 (a) Sprengring, (b) Deckglas, (c) Fixierungsnaht, (d) Sechskantmutter, (e) Halteschraube, (f) Ringfassung, (g) Titanrahmen, (h) Nahtlöcher für Fixierungsnähte, (i) Bohrloch für Halteschrauben

Die Präparation der Rückenhautkammer erfolgte unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops unter keimarmen Kautelen, nach sorgfältiger Desinfektion der Arbeitsfläche, des Präparierbestecks, sowie der Kammerteile mit 70 % Ethanol. Während der gesamten Präparation wurde darauf geachtet, unnötige Traumata durch das Besteck an dem zu präparierenden *Panniculus carnosus* und dessen Austrocknung mittels Aufträufeln von steriler isotoner NaCl-Lösung (Natriumchloridlösung 0,9 %; Braun, Deutschland) zu vermeiden. Um das Risiko einer bakteriellen Kontamination zu reduzieren und das Narkoserisiko für das Tier gering zu halten, war eine zügige Arbeitsweise nötig (30-40 min).



Abb. 8: NMRI nu/nu mit dorsaler Rückenhautkammer.

Es folgt eine Auflistung der notwendigen Arbeitsschritte zur Kammerpräparation adaptiert nach Brown et al. (Brown et al. 2010) und Sckell et al. (Sckell und Leunig 2009), Abb. 9, S.25:

1. Allgemeinanästhesie der Maus (NMRI nu/nu, Körpergewicht (KG) 25-32 g, Alter 5-10 Wochen) mit intraperitonealer Injektion eines Gemisches aus 10 % Ketamin® (bela-pharm, Deutschland) und 2 % Xylazin® (Bayer HealthCare, Deutschland) mit einer Dosierung von 75 mg Ketamin®/kgKG und 5 mg Xylazin®/kgKG.
2. Lagerung der Maus auf einer Wärmeplatte (37,5 °C) mit Mullkompressen (ES-Kompressen®, 7,5 cm x 7,5 cm; Paul-Hartmann AG, Deutschland) mit Augenmerk auf einen freien Atemweg. Zum Schutz vor Austrocknung der Kornea bei erloschenem Lidschlussreflex wurde Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Bayer HealthCare, Deutschland) mittels *No-Touch*-Technik aufgebracht.
3. Gründliche Desinfektion der Rückenhaut mit einem Hautdesinfektionsmittel (Octeniderm® farblos; Schülke & Mayr, Deutschland)
4. Begutachtung der anatomischen Verhältnisse (Gefäßverläufe) der Rückenhaut unter Gegenlicht und anschließende Markierung der Rückenmittellinie bzw. der Fixierungsstellen, sowie der unbedingt zu schonenden Hautgefäße zur Festlegung der Schraubendurchtrittstellen. Abb. 9a, S.25.
5. Fixierung der Rückenhaut am Spannrahmen und Aufspannen derselben mit dezentem Zug. Abb. 9b, S.25.

6. Anbringen der Rückseite der Rückenhautkammer unter strenger Schonung der Rückengefäße und Beachtung der Mittellinie und Längsrichtung zum nötigen Erhalt der Bewegungsfreiheit des Tieres mit Annaht, sowie Präparation der Schraubendurchtrittsstellen. Abb. 9c, S.25.
7. Markierung des Präparationsbereiches unter Gegenlicht, welches die Öffnung der Rückenhautkammer auf die Haut projiziert. Abb. 9d, S.25.
8. Entfernung der Spannfäden und Umlagern der Maus in Seitenlage. Abb. 9e, S.25.
9. Ausschneiden der markierten Hautfläche (Kutis, Subkutis, *Panniculus carnosus*). Dabei ist darauf zu achten, dass die großen Hautgefäße scharf und im rechten Winkel durchtrennt und die nötigen Schnitte klar geführt werden. Nur so können Blutungen vermieden und eine präzise Öffnung für den Kammerrahmen geschaffen werden. Abb. 9f und g, S.25.
10. Aufsuchen der Präparierebene unmittelbar auf dem *Panniculus carnosus* der gegenseitigen Haut und Abheben des gesamten bedeckenden Bindegewebes in einem Stück. Abb. 9h, S.25.
11. Anbringen der Vorderseite der Rückenhautkammer, Befüllen der Kammer mit steriler isotoner NaCl-Lösung, Einbringen des Deckglases unter Vermeidung von Lufteinschlüssen und ebene Fixierung mit dem Sprengring. Dabei ist unbedingt eine Kompression der zu- und abführenden Gefäße zu vermeiden. Abb. 9, S.25.
12. Verbringen der Maus in einen Einzelkäfig unter Infrarotlicht und visuelle Überwachung bis zum vollständigen Erwachen des Tieres aus der Narkose.

Die so angelegten Kammern ermöglichten die Beobachtung des präparierten *Panniculus carnosus* und dessen Arteriolen, Venolen, Kapillaren und der neoangiogenen Gefäße des transplantierten Tumorgewebes über einen Zeitraum von 17, bzw. 14 Tagen. Während der gesamten Beobachtungszeit wurden die Tiere täglich auf unnatürliches Verhalten und

Zeichen von Entzündung der Rückenhautkammer, wie Rötung, Schwellung und seröse Sekretion überprüft und gegebenenfalls aus dem Experiment genommen.

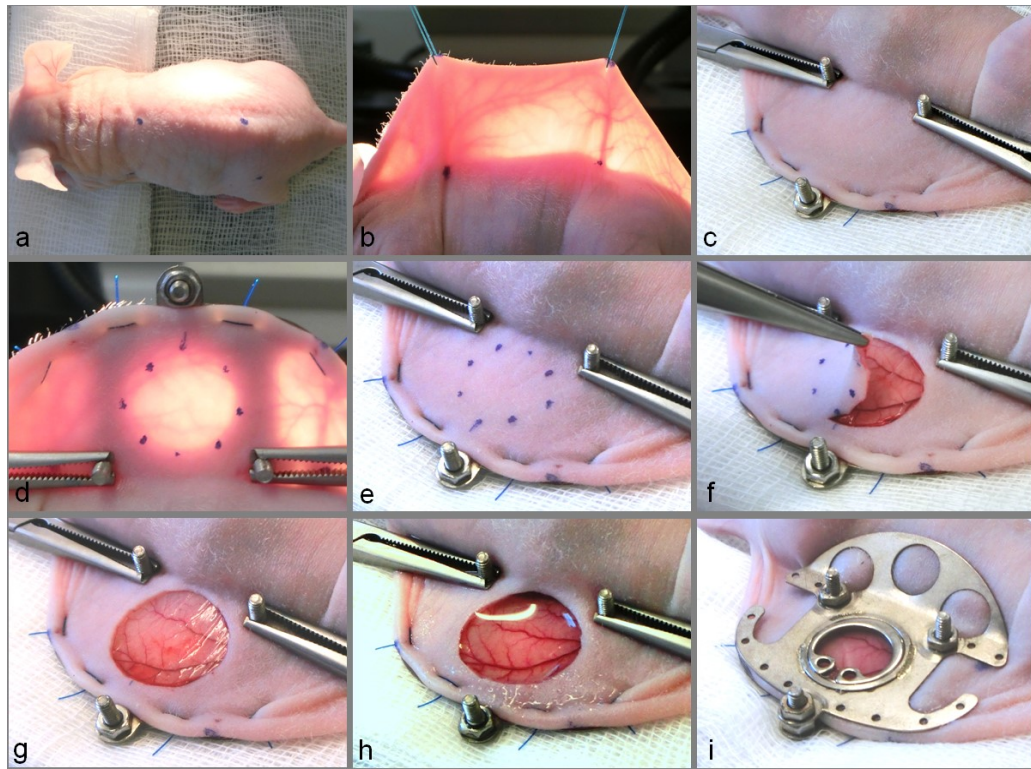


Abb. 9: Schritte der chirurgischen Präparation einer dorsalen Rückenhautkammer. (a) Markierung der Rückenmitte, (b) Aufspannen der Rückenhaut im Gegenlicht, (c) fertige Fixierungsnähte und Schraubendurchtritt, (d) Markierung des Präparationsbereiches im Gegenlicht, (e) Lagerung zur Präparation, (f) Eröffnen der Präparationsfläche, (g) Beginn der Mikropräparation, (h) Abschluss der Mikropräparation, (i) Kammerverschluss

2.3.2 Zellvorbereitung zur Transplantation

Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen einmal in PBSdef gewaschen und mit Trypsin/EDTA von der Platte gelöst. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Zellmedium (10 % fetales Kälberserum und *Dulbecco's Modified Eagle Medium*/DMEM, P04-03590; PANTM Biotech, Deutschland), welches bei Zellen mit lentiviraler Transfektion mit 2 µg/ml Puromycin versetzt wurde, aufgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß übertragen und abzentrifugiert (1200 U/min, 4 °C, 5 min). Dieser Schritt wurde wiederholt und anschließend der Überstand verworfen. Das resultierende Zellpellet mit einer Zellkonzentration von etwa $5 \times 10^5/\mu\text{l}$ wurde bis zur unmittelbar folgenden Transplantation auf Eiswasser gelagert.

2.3.3 Zelltransplantation

Die Transplantation der Zellen erfolgte am dritten Tag nach der Rückenhautkammer-Präparation und entsprechender Allgemeinanästhesie des Tieres und Desinfektion des Arbeitsplatzes (siehe 2.3.1, S.21). Nach Lösen des Sprengringes erfolgte einmaliges Spülen (2 ml) und anschließendes Füllen (1-2 Tropfen) der Rückenhautkammer mit steriler isotoner NaCl-Lösung. In die gefüllte Rückenhautkammer wurde nun ein Zellpellet (0,8 µl, ca. 4×10^5 Zellen) mit Hilfe einer sterilen Mikropipette (0,1-2,5 µl; Eppendorf, Deutschland) zentral in die Rückenhautkammer eingebracht. Um den Tumor während des Beobachtungszeitraumes im Sichtfenster zu halten, wurde bei der Positionierung beachtet, dass sich die Haut 2-4 mm in Richtung des Rückens der Maus streckt. Abschließend erfolgte der erneute Verschluss der Rückenhautkammer mit einem Deckglas und die Sicherung mit dem Sprengring. Hierbei wurde besonders Sorge dafür getragen, dass die Zellen ihre Position und Anordnung während des Abdeckens beibehalten, Abb. 10, S.26.

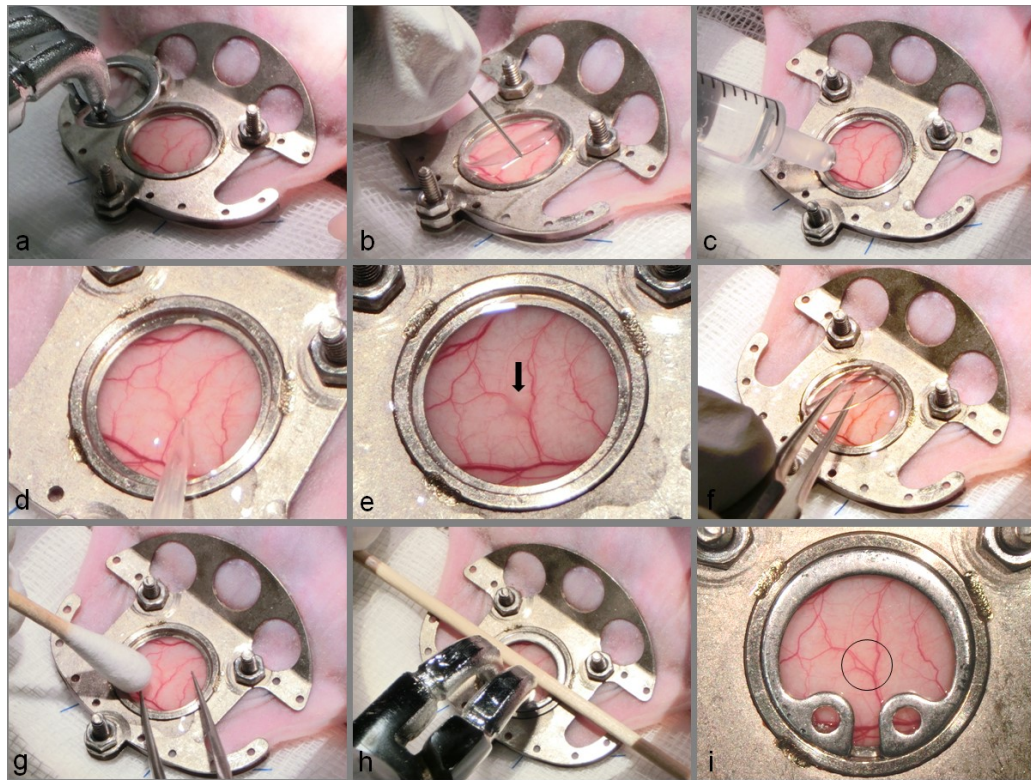


Abb. 10: Arbeitsschritte der Zelltransplantation am dritten Tag nach Rückenhautkammer-Präparation. (a) Entfernung des Sprengringes, (b) Heben des Deckglases, (c) Spülen der Kammer, (d) Einbringen der Zellen mittels Mikropipette, (e) Lage der Zellen etwas oberhalb des Kammerzentrums (Pfeil), (f) Auflegen des neuen Deckglases, (g) Absaugen der Kochsalzlösung, (h) Wiederverschluss mit Sprengring, (i) Lage der Zellen nach Kammerverschluss (Kreis)

2.4 Intravitale Epifluoreszenz-Videomikroskopie

2.4.1 Farbstoff

Zur Kontrastanhebung des Plasmas unter Blaulicht-Epi-Illumination (λ : 450-490 nm) wurde den Mäusen unmittelbar vor der Intravitalmikroskopie in Allgemeinanästhesie (wie in 2.3.1) 0,1 ml 2 % Fluoreszeinisothiocyanat-Dextran (2 % FITC-Dextran, MW 150 kDa, Exzitation_{max}/Emission_{max} λ : 490 nm/520 nm; Sigma-Aldrich, Deutschland) retrobulbär injiziert (Yardeni et al. 2011; Socher et al. 2014).

2.4.2 Datenaufnahme

Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurden direkt nach erfolgter retrobulbärer Administration des Fluorochroms (siehe 2.4.1, S.27) in Allgemeinanästhesie (siehe 2.3.1, S.21) durchgeführt. Das Fluoreszenzmikroskop (Axiotech® vario; Carl-Zeiss AG, Deutschland) mit einer stufenlos regelbaren Quecksilberbogenlampe (HBO 103W/2; Carl-Zeiss AG, Deutschland) war mit einem passenden Blaulichtfiltersystem für FITC (λ : 450-490 nm) ausgerüstet. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe einer CCD-Videokamera (FK 6990A-IQ; Pieper GmbH, Deutschland) registriert und wurden sowohl mit einem *digital-versatile-disc*-System (DVR-RT602H-S; Pioneer Cooperation, Japan) aufgezeichnet als auch an einem Monitor wiedergegeben. Während der intravitalmikroskopischen Aufnahmen waren die Tiere mit den Rückenhautkammern auf einer Acrylgaslafette fixiert, um atmungsabhängige Bewegungen zu vermeiden und klares Visualisieren des Tumorgewebes zu ermöglichen (Lunt et al. 2010). Es kamen drei Objektive zur Anwendung (5x/0,12 A-Plan, 10x/0,30 Plan-NEOFLUAR und 20x/0,5 Plan-NEOFLUAR; Carl-Zeiss, Deutschland). Die geringe Vergrößerungsstufe wurde zur Bestimmung der Tumorfläche (TA), respektive der vaskularisierten Tumorfläche (VTA) herangezogen (siehe Abb. 11, S.28). Die mittlere Vergrößerungsstufe wurde zur Bestimmung der funktionellen vaskulären Dichte (FCD) verwendet. Die stärkste Vergrößerung wurde für Detailaufnahmen herangezogen.

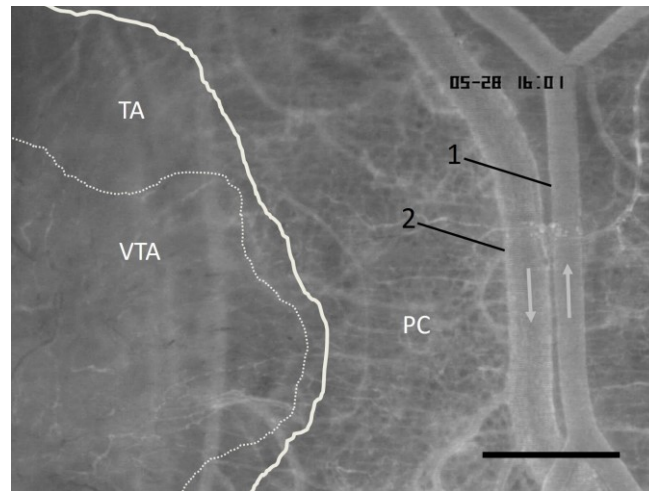


Abb. 11: Intravitalmikroskopische Aufnahme einer tumortragenden Rückenhautkammer. Das Plasma wurde mit FITC-Dextran (MW 150 kDa, 2 %, Exzitation_{max}/Emission_{max} λ : 490 nm/520 nm) in Blaulichtepiillumination (λ : 450-490 nm) sichtbar gemacht und somit hell kontrastiert. Gezeigt sind eine Arteriole (1) und eine Venole (2). Die Pfeile zeigen die jeweilige Flussrichtung. Im linken Bildausschnitt sind die unscharf erscheinende Tumorfäche (TA) und inliegend die vaskularisierte Tumorfäche (VTA) mit chaotisch verlaufendem Tumorgefäßnetz gezeigt. Das tumorfreie Areal rechts zeigt die muskuläre Schicht, den *Panniculus carnosus* mit regelmäßigen, horizontal verlaufenden und vertikal vernetzten Kapillaren, welche die quergestreifte Muskulatur der Kutis versorgen, Eichstrich 500 μ m.

2.5 Histomorphologie

2.5.1 Hämatoxylin-Eosin

Nach abgeschlossener Intravitalmikroskopie am 14. Tag wurden die tumortragenden Rückenhautlappen en-block asserviert. Anschließend für 2-3 Tage in phosphatgepuffertem 4 % Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden 4 μ m dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger (Engelbrecht, Deutschland) übertragen und nach Routineprozedur mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

2.5.2 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden dieselben Paraffinblöcke, wie für die HE-Färbung verwendet (siehe 2.5.1, S.28). Es wurden wiederum 4 μ m dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger (POLYSINE®, Gerhard-Menzel GmbH, Deutschland) übertragen. Die proliferierenden Zellen wurden mittels *proliferating cell nuclear antigen* (pcna) analysiert. Die Schnitte wurden nach Entparaffinierung über Nacht (4 °C) mit dem Primärantikörper

(mouse-anti-PCNA, 1:200, PC10:sc-56; Santa Cruz Biotechnology, USA) inkubiert, anschließend mit dem Sekundärantikörper (Peroxidase-konjugiert goat-anti-mouse, 1:100, HRP, P0447; Dako, Dänemark) und dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzin (DAB, K5001; Dako, Dänemark) behandelt. Proliferierende Zellen zeigen so chromogenpositives Zytoplasma. Die Endothelzellen wurden mittels *platelet endothelial cell adhesion molecule* (pecam-1, CD31, rabbit-anti-CD31, 1:50, ab28364; Abcam, UK) und mit Hilfe des Dako REAL™ Detection Systems (LSAB™)-Kit mit DAB Chromogen analysiert. Bei Endothelzellen wird so das endoluminale *Coating* chromogenpositiv. gfp wurde mit dem Primärantikörper (rabbit-anti-eGFP, 1:1000; Abcam, Cambridge, UK) und dem Sekundärantikörper (goat-anti-rabbit-alkaline-phosphatase; Dako Cytomation, Deutschland) mit *liquid permanent red*/LPR (Dako, Deutschland) als Chromogen angefärbt. Alle Schnitte wurden mit Hämalaun gegengefärbt. In den Negativkontrollen zeigte sich keine falsch positive Anfärbung durch den Sekundärantikörper.

2.6 Experimentelles Protokoll

2.6.1 Versuchsgruppen

Die Tiere (NMRI nu/nu, n=58, siehe 2.1, S.19) wurden zufällig einer von elf Versuchsgruppen zugeordnet, in denen unterschiedlich behandelte humane Melanomzellen (siehe 2.2, S.19) transplantiert wurden (SK-Mel-147, SK-Mel-29, 4×10^5 pro Rückenhautkammer). Die Transplantationen erfolgten wie unter 2.3.3 (S.26) beschrieben verblindet:

Versuchsgruppen mit SK-Mel-147:

- Zwei unterschiedliche Tumorzellgruppen mit E2F1-Knockdown (sh.E2F1#1, n=4; sh.E2F1#2, n=5) und Kontrolltumorzellen transfiziert mit sh.control (n=8)
- Tumorzellen mit VEGFR-3-Knockdown (sh.VEGFR-3, n=8) und Kontrolltumorzellen transfiziert mit sh.control (n=8), beide Vektoren GFP-gekoppelt
- Tumorzellen mit nicht funktionalem vegfr-3 (cDNA-DN-VEGFR-3/DN-VEGFR-3, n=5) und Kontrolltumorzellen transfiziert mit einem Leervektor (cDNA-empty/DN-Empty, n=5)

Versuchsgruppen mit SK-Mel-29:

- Tumorzellen mit E2F1-Überexpression (pcDNA3.1-E2F1) und Transfektion mit sh.control (n=2)
- Tumorzellen mit E2F1-Überexpression (pcDNA3.1-E2F1) und Transfektion mit sh.VEGFR-3 (n=2), oder chemischer vegfr-3-Inaktivierung (MAZ51, n=3)
- Kontrolltumorzellen mit Leervektor (pcDNA3.1) und Transfektion mit sh.control (n=8)

2.6.2 Versuchsablauf

Die Präparation der Rückenhautkammern erfolgte drei Tage vor der Zelltransplantation, um den Einfluss des chirurgischen Traumas zu minimieren. Die intravitalmikroskopische Datenaufnahme wurde jeweils an den Tagen 3, 5, 7, 10 und 14 nach der Zelltransplantation durchgeführt. Nach Abschluss der Aufnahmen des letzten Beobachtungstages wurde die Maus in Allgemeinanästhesie getötet und das Kammergewebe asserviert (siehe 2.5, S.28 und Abb. 12, S.30).

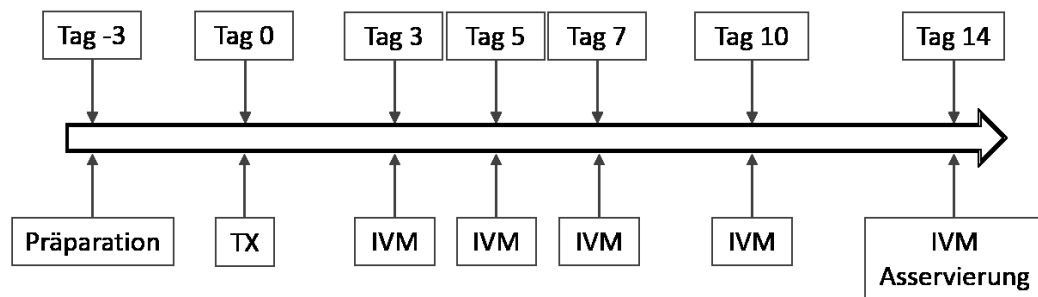


Abb. 12: Schematische Darstellung der experimentellen Teilschritte. 3 Tage vor der Zelltransplantation (TX) wurde die Rückenhautkammer präpariert. Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen (IVM) erfolgten an den Tagen 3, 5, 7, 10 und 14 nach Zelltransplantation, etwa 10-15 min pro Rückenhautkammer. Nach Abschluss der IVM am 14. Tag nach Zelltransplantation wurde die tumortragende Rückenhaut asserviert und histologisch aufgearbeitet.

2.6.3 Offlineanalyse und mikrozirkulatorische Parameter

Den intravitalmikroskopischen Aufnahmen folgte verblindet eine computerassistierte Offlineanalyse der dynamischen Tumorneoangiogenese (Capimage®; Zeintl, Deutschland). Es wurde die Tumorfläche (TA), die vaskularisierte Tumorfläche (VTA) und die funktionelle kapilläre Dichte (FCD), also die Gesamtlänge perfundierter Mikrogefäße pro vaskularisierter Tumorfläche (siehe Abb. 3, S.8), erhoben. Die Messung der FCD erfolgte in je 10 verschiedenen Abschnitten der VTA. Aus diesen Messungen wurde der

jeweilige Mittelwert bestimmt. Aus den erhobenen Parametern wurde die relative vaskularisierte Tumorfläche (rVTA) und die relative funktionelle kapilläre Dichte (rFCD) der Tumore mit den Formeln „ $rVTA = VTA/TA$ “ und „ $rFCD = FCD \cdot rVTA$ “ errechnet. Die Entblindung erfolgte nach abgeschlossener Offlineanalyse.

2.7 Statistik

Die Daten wurden nach dem Test auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk) und unter Beachtung der α -Kumulierung einer Varianzanalyse (*Two Way Repeated Messure Analysis of Variance*), sowie adäquaten multiplen Mittelwertsvergleichen (Holm-Sidak-Methode) unterzogen (SigmaPlot® 11.0, 2008; Systat Software, USA). Für statistische Signifikanz wurde ein Konfidenzniveau von mindestens 0,95 als ausreichend erachtet, $p < 0,05$. Die Ergebnisse sind als Einzelwerte, oder in ihrer Gesamtheit als Mittelwert, sowie Standardfehler des Mittelwerts angegeben (Mean \pm SEM).

3. Ergebnisse

3.1 E2F1-Knockdown

Um den Einfluss von e2f1 auf die Neoangiogenese zu untersuchen, wurden xenogene amelanotische Melanomzellen (SK-Mel-147, 4×10^5 , starke endogene E2F1-Expression) in dorsale Rückenhautkammern an männlichen Nacktmäusen implantiert. Es kamen drei Versuchsgruppen zum Einsatz: zwei E2F1-Knockdownansätze (sh.E2F1#1, n=4 und sh.E2F1#2, n=5) sowie die Kontrollgruppe (sh.control, n=8). Die Ausbildung eines frühen Tumorgefäßnetzwerks wurde über 2 Wochen wiederholt mittels Intravitalmikroskopie aufgezeichnet und anschließend offline ausgewertet. Im Anschluss an diese Beobachtungszeit wurden die tumortragenden Hautstücke asserviert und histologisch untersucht.

Bereits am 3. Tag nach Transplantation ließen sich erste Anzeichen der Neovaskularisierung erkennen: kleine petechiale Einblutungen und erste Gefäßsprossen. Ab dem 5. Tag war die Gefäßneubildung nicht mehr zu übersehen. Es kam teilweise zu größeren Einblutungen, zur Ausbildung von größeren Tumorblutgefäßen und zur Dilatation von Mutterblutgefäßen. Auch zeigte sich ab dem 7. Tag ein Unterschied zwischen Kontrolltumoren und dem E2F1-Knockdown, welcher im weiteren Versuchsverlauf noch deutlicher wurde (siehe Abb. 13, S.33). Betrachtet man die intravitalmikroskopische Auswertung, so zeigte sich im Verlauf des Versuchs in allen Gruppen eine leichte Reduktion der Tumorfläche von $18,3 \pm 2,5 \text{ mm}^2$ am 3. Tag zu $10 \pm 1,8 \text{ mm}^2$ am 14. Tag. Zwischen den verschiedenen Gruppen zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied bezüglich der gemessenen Tumorfläche (siehe Abb. 14a, S.34). Am 5. Tag waren bereits im Mittel $55,0 \pm 5 \%$, am 14. Tag waren im Mittel $90,0 \pm 5 \%$ der Tumorfläche aller Gruppen vaskularisiert. Der stärkste Zuwachs der rVTA war zwischen dem 3. und 5. Tag von im Mittel $16 \pm 5 \%$ auf $55 \pm 5 \%$ zu verzeichnen. Die rVTA und deren Zuwachs im Verlauf unterscheiden sich zwischen den Behandlungen nicht signifikant (siehe Abb. 14b, S.34). Betrachtet man das funktionelle Tumorgefäßnetz, welches sich im Verlauf ausbildete, so fand sich bei allen Gruppen vom 3. zum 14. Tag ein signifikanter Anstieg der FCD. Am 3. Tag zeigte die Kontrollgruppe eine FCD von $78,9 \pm 33,0 \text{ cm/cm}^2$. Am 14. Tag wurde hier bereits eine FCD von $303,1 \pm 21,4 \text{ cm/cm}^2$ gemessen. Am 14. Tag zeigte sich so die FCD des E2F1-Knockdown mit $212,8 \pm 14 \text{ cm/cm}^2$ (sh.E2F1#1) bzw. $222,0 \pm 14,9 \text{ cm/cm}^2$ (sh.E2F1#2) signifikant niedriger als die FCD der Kontrollgruppe

(siehe Abb. 15a, S.34). Die rFCD als Maß für die Vaskularisation nahm ebenso innerhalb aller Gruppen vom 3. zum 14. Tag signifikant zu. Am 3. Tag wurde in der Kontrollgruppe eine rFCD von $37,0 \pm 21,4 \text{ cm/cm}^2$ und am 14. Tag ein rFCD von $291,0 \pm 27,2 \text{ cm/cm}^2$ gemessen. Die rFCD der E2F1-Knockdowngruppen waren am 14. Tag mit $188,9 \pm 19 \text{ cm/cm}^2$ (sh.E2F1#1) bzw. $196,3 \pm 26,1 \text{ cm/cm}^2$ (sh.E2F1#2) signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe (siehe Abb. 15b, S.34). Die repräsentativen intravitalmikroskopischen Bilder in Abb. 16 (S.34) illustrieren die deutlich höhere Gefäßdichte in den Kontrolltumoren gegenüber den Tumoren mit E2F1-Knockdown. Ebenso erkennt man die typische chaotische Tumorgefäßarchitektur mit unterschiedlichen Gefäßdiametern, stark schwankenden Aufzweigungswinkeln, inhomogenem Hämatokrit und teilweise nicht funktionellen Gefäßen (siehe Abb. 3, S.8 und Abb. 11, S.28). In der histologischen Aufarbeitung wurde deutlich, dass die blutführenden Gefäße im Tumorgewebe endothelial ausgekleidet sind. Ebenso zeigte sich die Größenvarianz der Tumorgefäße (siehe Abb. 17, S.35 und Abb. 18, S.35). Auch zeigten die Tumorzellen über den gesamten Beobachtungszeitraum Proliferationsaktivität, erkennbar an der PCNA-Expression im Zytoplasma (siehe Abb. 19, S.35).

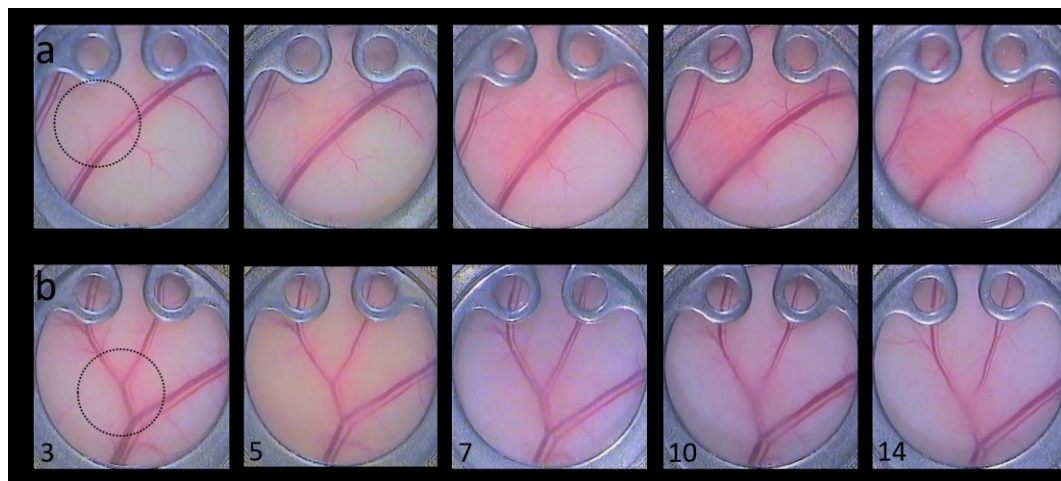


Abb. 13: Makroskopie des Tumorwachstums bzw. der Neoangiogenese im zeitlichen Verlauf von links nach rechts (3. bis 14. Tag). (a) *SK-Mel-147 kontrollbehandelt*, (b) *E2F1-Knockdown*. Der Tumor (Kreis) wurde mit zunehmender Durchblutung als rötlicher Bereich erkennbar. Makroskopisch sicher zu erkennen war die beginnende Neovaskularisierung ab dem 5. Tag in der kontrollbehandelten Gruppe. Ebenso ließ sich der Tumor im Verlauf klarer vom tumorfreien Kammerareal abgrenzen. Deutlich zeigte sich bereits makroskopisch die verminderte Gefäßneubildung durch den E2F1-Knockdown. Die Rückenhaut streckte sich im Verlauf des Beobachtungszeitraums. Daher wurden die Arteriolen, Venolen und der Tumor zum unteren Rand der Kammer verlagert. Der sichtbare Kammerdurchmesser beträgt etwa 12 mm.

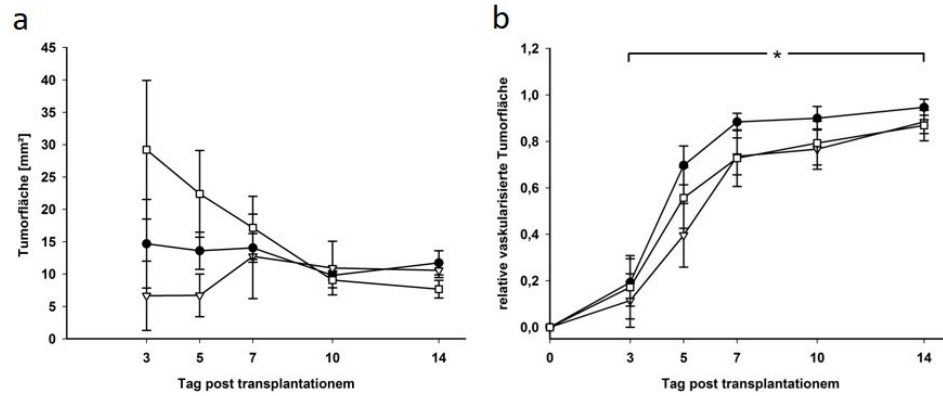


Abb. 14: TA [mm²] (a) und rVTA (b) im Verlauf nach xenogener Transplantation von sh.control- (gefüllte Kreise, n=8), sh.E2F1#1- (leere Dreiecke, n=4) und sh.E2F1#2- (leere Quadrate, n=5) behandelten Zellen (SK-Mel-147), * p<0,05 im Zeitverlauf aller Gruppen, Mean±SEM.

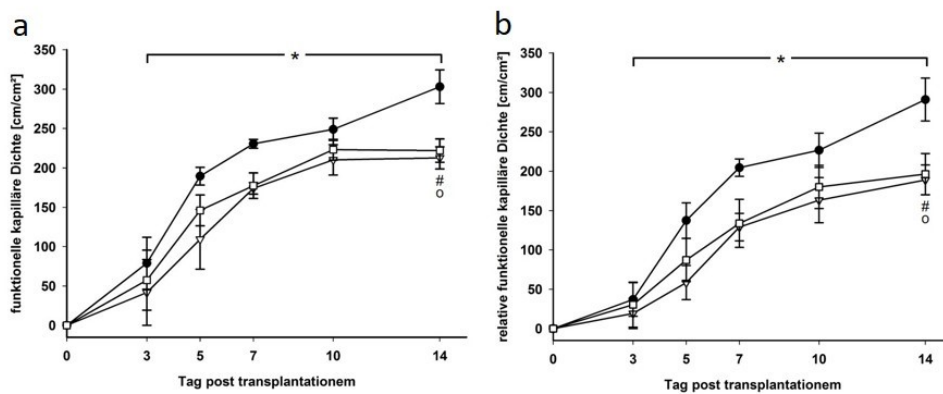


Abb. 15: FCD [cm/cm²] (a) und rFCD [cm/cm²] (b) im Verlauf nach xenogener Transplantation von sh.control- (gefüllte Kreise, n=8), sh.E2F1#1- (leere Dreiecke, n=4) und sh.E2F1#2- (leere Quadrate, n=5) behandelten Zellen (SK-Mel-147), ° p<0,05 sh.E2F1#1 vs. Kontrolle zum jeweiligen Messzeitpunkt, # p<0,05 sh.E2F1#2 vs. Kontrolle zum jeweiligen Messzeitpunkt und * p<0,05 im Zeitverlauf aller Gruppen, Mean±SEM.

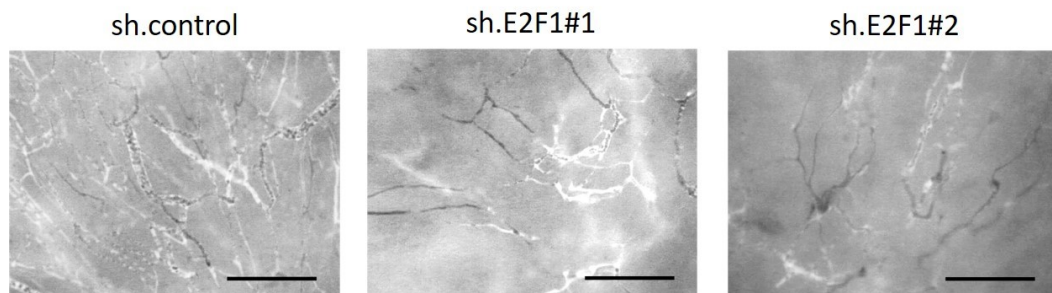


Abb. 16: Intravitalmikroskopische Aufnahme repräsentativer Ausschnitte gefäßtragender Tumorbereiche am 14. Tag. Das Plasma wurde mit FITC-Dextran (MW 150 kDa, 2 %, Exzitation_{max}/Emission_{max} λ: 490 nm/520 nm) in Blaulichtepiillumination (λ: 450-490 nm) sichtbar gemacht und somit hell kontrastiert, Eichstriche 100 µm.

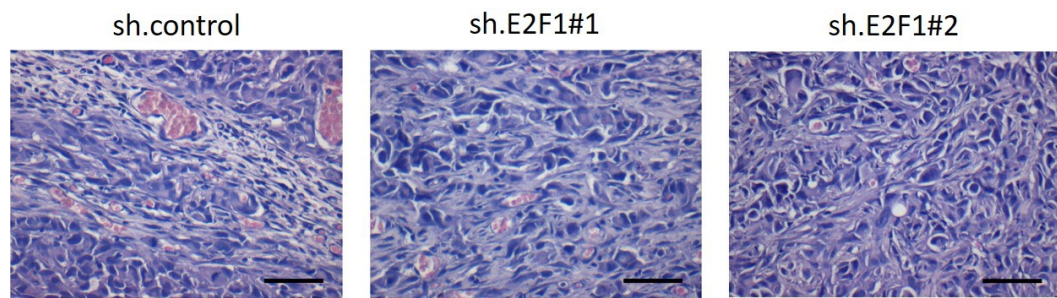


Abb. 17: HE gefärbte Schnitte der Tumore am 14. Tag. Gut erkennbar sind hier das chaotische Tumorstroma und mit Erythrozyten gefüllte Kapillaren, Eichstriche 50 μ m.

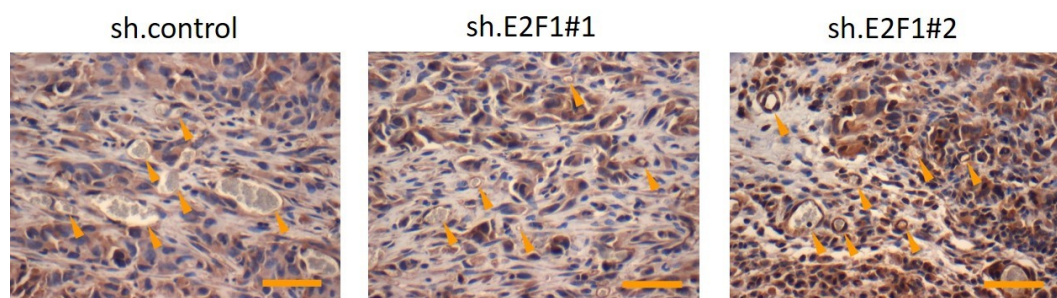


Abb. 18: Immunhistochemie mit Anti-CD31 der Tumore am 14. Tag. Gezeigt sind die chromogenpositiven mit Erythrozyten gefüllten Kapillaren (Pfeilspitzen). Die Kapillaren sind somit endothelial ausgekleidet, Eichstriche 50 μ m.

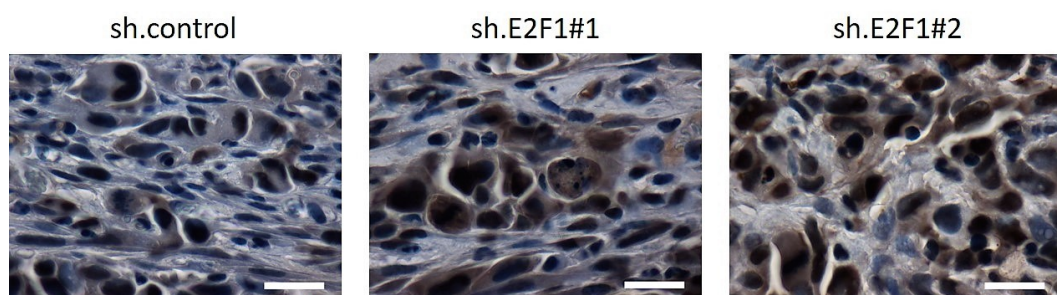


Abb. 19: Immunhistochemie mit Anti-PCNA der Tumore am 14. Tag. Erkennbar sind das chaotische Tumorstroma, proliferierende Tumorzellen mit einigen Mitosen (Mitoseformationen und chromogenpositives Zytoplasma) unterschiedlichen Fortschritts, Eichstriche 15 μ m.

3.2 VEGFR-3

3.2.1 VEGFR-3-Knockdown

Um den Einfluss von vegfr-3 auf die Neoangiogenese zu untersuchen, wurden xenogene amelanotische Melanomzellen (SK-Mel-147, 4×10^5 , starke endogene E2F1-Expression) in dorsale Rückenhautkammern an männlichen Nacktmäusen (NMRI nu/nu) implantiert. Es kamen zwei Versuchsgruppen zum Einsatz: ein VEGFR-3-Knockdownansatz (sh.VEGFR-3, n=8) sowie die Kontrollgruppe (sh.control, n=8). Die Ausbildung eines frühen Tumorgefäßnetzwerks wurde über 2 Wochen wiederholt mittels Intravitalmikroskopie aufgezeichnet und anschließend offline ausgewertet. Im Anschluss an diese Beobachtungszeit wurden die tumortragenden Hautstücke asserviert und histologisch untersucht.

Ähnlich dem Experiment mit E2F1-Knockdown waren hier makroskopisch ab dem 7. Tag deutliche Unterschiede bezüglich der Neoangiogenese zwischen den Kontrolltumoren und den Tumoren mit VEGFR-3-Knockdown erkennbar. Intravitalmikroskopisch verhielt sich die Tumorfläche in beiden Gruppen gleich. Die mittlere Tumorfläche von $20,1 \pm 1,1 \text{ mm}^2$ am 3. Tag verringerte sich zum 14. Tag auf $12,9 \pm 1,3 \text{ mm}^2$ (Abb. 20a, S.37). Am 3. Tag waren im Mittel bereits $21 \pm 5 \%$ der Tumorfläche vaskularisiert. Zum 5. Tag hin zeigte sich die stärkste Zunahme der relativen vaskularisierten Tumorfläche auf $51 \pm 5 \%$. Ab dem 7. Tag war die rVTA der VEGFR-3-Knockdown-Tumore signifikant geringer als die der Kontrolltumore (sh.control vs. sh.VEGFR-3: 7. Tag $0,76 \pm 0,05$ vs. $0,43 \pm 0,1$, 10. Tag $0,81 \pm 0,06$ vs. $0,51 \pm 0,13$, 14. Tag $0,84 \pm 0,03$ vs. $0,53 \pm 0,11$). Beide Gruppen verhielten sich bezüglich der rVTA durch voneinander abhängige Messungen im gesamten Verlauf signifikant unterschiedlich (siehe Abb. 20b, S.37). Die FCD stieg auch in diesem Experiment in beiden Gruppen zwischen dem 3. und 14. Tag signifikant an, von $130,9 \pm 9,6 \text{ cm/cm}^2$ am 3. Tag auf $271 \pm 16,1 \text{ cm/cm}^2$ am 14. Tag in der Kontrolle und von $107,6 \pm 23,5 \text{ cm/cm}^2$ am 3. Tag auf $178,2 \pm 17,9 \text{ cm/cm}^2$ am 14. Tag bei dem VEGFR-3-Knockdown. Am 14. Tag wurden diese Unterschiede signifikant (Abb. 21a, S.37). Betrachtet man die Vaskularisierung, so unterschieden sich die beiden Gruppen bereits ab dem 7. Tag signifikant, um dann am 14. Tag den deutlichsten Unterschied zu zeigen. Die rFCD der Kontroll-Tumore betrug am 14. Tag $229,3 \pm 19,1 \text{ cm/cm}^2$, wohingegen die VEGFR-3-Knockdown-Tumore lediglich eine rFCD von $100,7 \pm 27,6 \text{ cm/cm}^2$ erreichten. Dies entsprach einer Halbierung der Vaskularisierung (siehe Abb. 21b, S.37). Abb. 22 (S.38) zeigt zwei repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen, welche die

unterschiedliche Anatomie des Tumorgefäßnetzwerks der beiden Gruppen am 14. Tag erkennen lässt. Histologisch ließen sich endothelialisierte Tumorgefäße unterschiedlichen Durchmessers nachweisen (siehe Abb. 23, S.38 und Abb. 24, S.38). Im gesamten Beobachtungszeitraum proliferierten die Tumorzellen und exprimierten das jeweilige Vektorkonstrukt, was an der PCNA- und GFP-Färbung des Zytoplasmas deutlich wird (siehe Abb. 25, S.39 und Abb. 26, S.39).

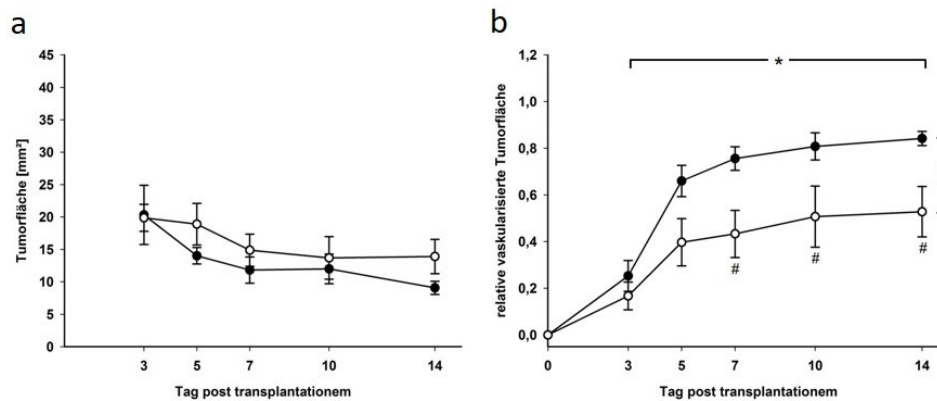


Abb. 20: TA [mm²] (a) und rVTA (b) im Verlauf nach xenogener Transplantation von sh.control- (gefüllte Kreise, n=8) und sh.VEGFR-3- (leere Kreise, n=8) behandelten Zellen (SK-Mel-147), # p<0.05 vs. sh.control, * p<0.05 im Zeitverlauf aller Gruppen und × p<0.05 sh.control vs. sh.VEGFR-3 im gesamten Verlauf, Mean±SEM.

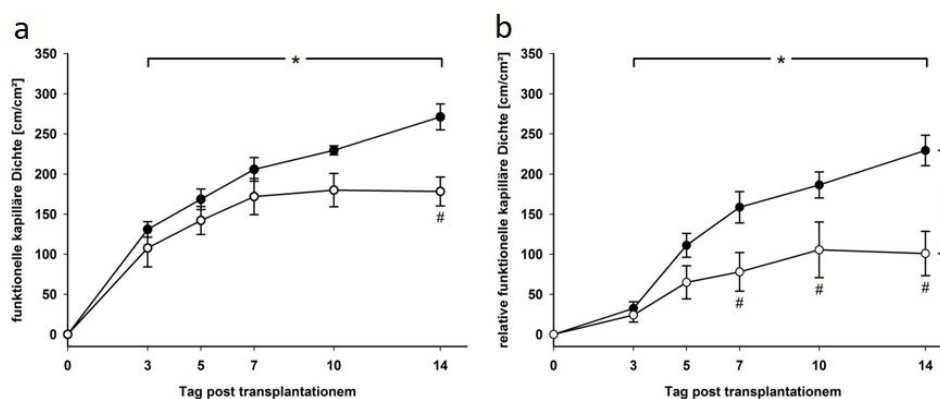


Abb. 21: FCD [cm/cm²] (a) und rFCD [cm/cm²] (b) im Verlauf nach xenogener Transplantation von sh.control- (gefüllte Kreise, n=8), sh.VEGFR-3- (leere Kreise, n=8) behandelten Zellen (SK-Mel-147), # p<0.05 vs. sh.control, * p<0.05 im Zeitverlauf aller Gruppen und × p<0.05 sh.control vs. sh.VEGFR-3 im gesamten Verlauf, Mean±SEM.

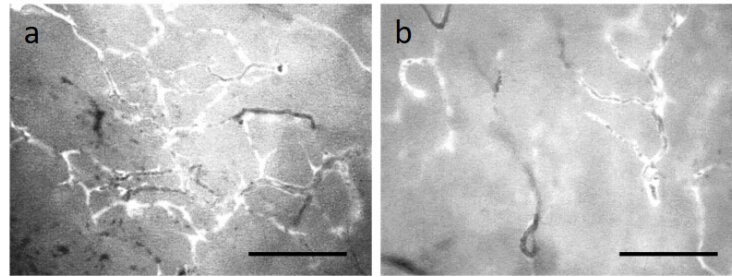


Abb. 22: Intravitalmikroskopische Aufnahme repräsentativer Ausschnitte gefäßtragender Tumorbereiche am 14. Tag. sh.control (a), sh.VEGFR-3 (b). Das Plasma wurde mit FITC-Dextran (MW 150kDa, 2 %, $\text{Exzitation}_{\text{max}}/\text{Emission}_{\text{max}} \lambda: 490\text{nm}/520\text{nm}$) in Blaulichtepiillumination ($\lambda: 450\text{-}490\text{nm}$) sichtbar gemacht und somit hell kontrastiert, Eichstriche 100 μm .

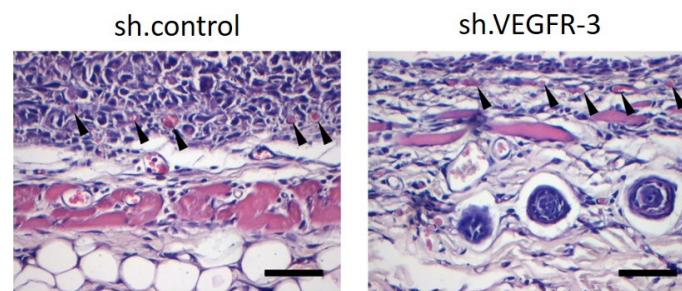


Abb. 23: HE gefärbte Schnitte der Tumore am 14. Tag. Gezeigt sind das chaotische Tumorstroma am Übergang zum *Panniculus carnosus* und mit Erythrozyten gefüllte Kapillaren (Pfeilspitzen), Eichstriche 50 μm .

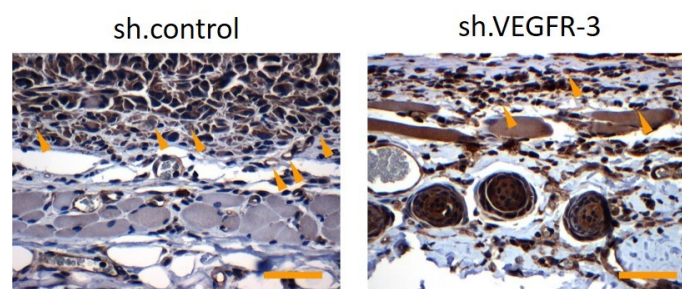


Abb. 24: Immunhistochemie mit Anti-CD31 der Tumore am 14. Tag. Erythrozyten gefüllte chromogenpositive Kapillaren (Pfeilspitzen). Die Kapillaren sind somit endothelial ausgekleidet, Eichstriche 50 μm .

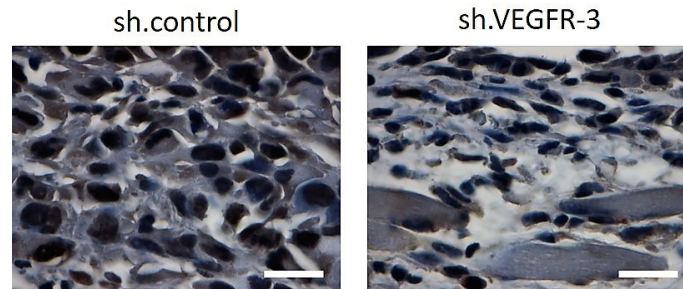


Abb. 25: Immunhistochemie mit Anti-PCNA der Tumore am 14. Tag. Gezeigt sind das chaotische Tumorstroma, proliferierende Tumorzellen in Kontroll- und Behandlungsgruppe mit einigen Mitosen (Mitoseformationen und chromogenpositives Zytosol) unterschiedlichen Fortschritts, Eichstriche 15 μ m.

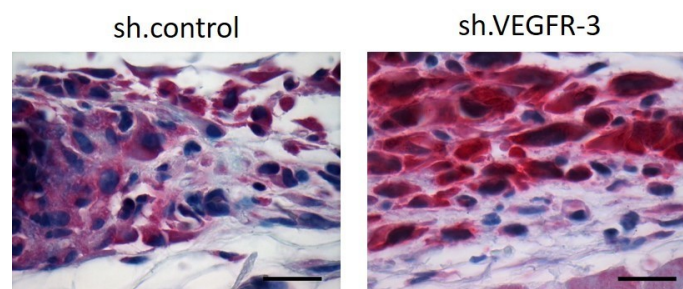


Abb. 26: Immunhistochemie mit Anti-GFP der Tumore am 14. Tag. Die Tumorzellen beider Gruppen zeigen GFP-Positivität (liquid permanent red), exprimieren also das jeweilige Vektorkonstrukt, Eichstriche 15 μ m.

3.2.2 vegfr-3-Inaktivierung

Um den Einfluss von vegfr-3 auf die Neoangiogenese zu untersuchen, wurden xenogene amelanotische Melanomzellen (SK-Mel-147, 4×10^5 , starke endogene E2F1-Expression) in dorsale Rückenhautkammern an männlichen Nacktmäusen (NMRI nu/nu) implantiert. Es kamen zwei Versuchsgruppen zum Einsatz: ein Ansatz mit vegfr-3-Inaktivierung mittels lentiviraler Transfektion mit einem Vektor, welcher für ein infunktionelles vegfr-3-Monomer codiert und so zu infunktionellen vegfr-3-Homodimeren führt (DN-VEGFR-3, n=5) sowie die Kontrollgruppe, die mit einem Leervektor transfiziert wurde (DN-Empty, n=5). Die Ausbildung eines frühen Tumorgefäßnetzwerks wurde über 2 Wochen wiederholt mittels Intravitalmikroskopie aufgezeichnet und anschließend offline ausgewertet. Im Anschluss an diese Beobachtungszeit wurden die tumortragenden Hautstücke asserviert und histologisch untersucht.

Anders als beim VEGFR-3-Knockdown wurde hier die Wirkung der Behandlung makroskopisch erst sehr spät, etwa am 10. Tag, erkennbar. Intravitalmikroskopisch objektiviert veränderte sich die Tumorfläche durch die Behandlung nicht signifikant. Die

Tumorfläche nahm vom 3. Tag zum 14. Tag von im Mittel $12,3 \pm 0,7 \text{ mm}^2$ auf $7,7 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ ab. Dies ist eine signifikante Abnahme der TA über den Verlauf des Versuchs (siehe Abb. 27a, S.41). Die Tumore vaskularisierten zügig. Von im Mittel nur $0,10 \pm 0,04 \text{ rVTA}$ am 3. Tag betrug die rVTA am 5. Tag bereits $0,44 \pm 0,04$ und am 7. Tag $0,72 \pm 0,04$. Zum 10. Tag stieg die rVTA noch in beiden Gruppen, um dann in beiden Gruppen zum 14. Tag wieder leicht abzufallen. Am 14. Tag zeigte sich dann ein signifikanter Effekt der Behandlung. Die Kontrolltumore wiesen am 14. Tag mit einer rVTA von $0,88 \pm 0,05$ eine flächigere Neoangiogenese auf als die Tumore mit vegfr-3-Inaktivierung mit einer rVTA von $0,64 \pm 0,14$ (siehe Abb. 27b, S.41). Die FCD unterschied sich zunächst am 3. Tag signifikant, um sich dann im Verlauf anzugleichen. Die FCD der Kontrolltumore hatte am 3. Tag bereits $117,2 \pm 30,9 \text{ cm/cm}^2$ erreicht, wohingegen die Tumore mit vegfr-3-Inaktivierung lediglich eine FCD von $46,4 \pm 19,0 \text{ cm/cm}^2$ aufwiesen. Ab dem 5. Tag unterschied sich die FCD der beiden Behandlungen nicht mehr. Die FCD der Kontrolltumore stieg zum 14. Tag auf $260,8 \pm 7,9 \text{ cm/cm}^2$, die FCD der behandelten Tumore stieg bis zum 14. Tag auf $215,7 \pm 34,0 \text{ cm/cm}^2$ (siehe Abb. 28a, S.41). Die rFCD als Maß für die Vaskularisierung unterschied sich ab dem 10. Tag signifikant zwischen den beiden Gruppen. Die Kontrolltumore erreichten am 10. Tag eine rFCD von $203,1 \pm 24,6 \text{ cm/cm}^2$ und am 14. Tag eine rFCD von $231 \pm 17,9 \text{ cm/cm}^2$, wohingegen die Tumore mit vegfr-3-Inaktivierung am 10. Tag lediglich eine rFCD von $115,8 \pm 11,5 \text{ cm/cm}^2$ und am 14. Tag von $130,1 \pm 20,4 \text{ cm/cm}^2$ aufwiesen. Beide Gruppen verhielten sich bezüglich der rFCD durch voneinander abhängigen Messungen im gesamten Verlauf signifikant unterschiedlich (siehe Abb. 28b, S.41). Abb. 29 (S.41) zeigt repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen am 14. Tag der unterschiedlich behandelten Tumore. Die durch die Behandlung verminderte FCD wird in den Aufnahmen deutlich. Histologisch ließen sich bei allen Tumoren endothelialisierte Tumorgefäße mit unterschiedlichen Diametern und proliferierenden Tumorzellen im Tumorgewebe nachweisen (siehe Abb. 30, S.42, Abb. 31, S.42 und Abb. 32, S.42).

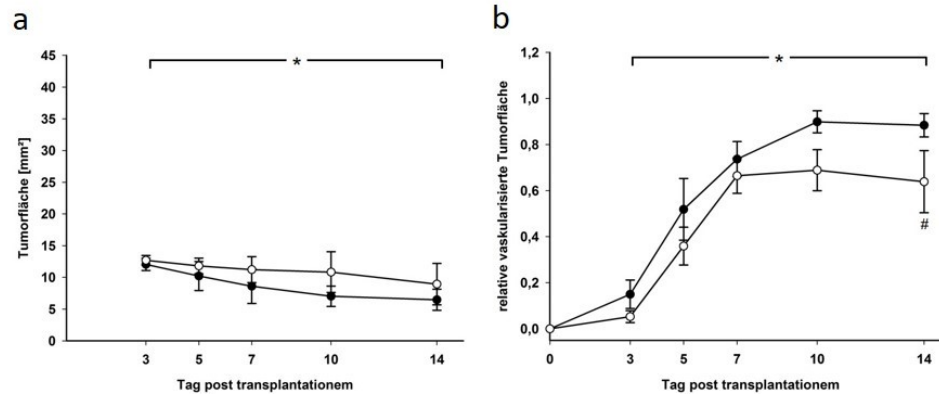


Abb. 27: TA [mm²] (a) und rVTA (b) im Verlauf nach xenogener Transplantation von DN-Empty- (gefüllte Kreise, n=5) und DN-VEGFR-3- (leere Kreise, n=5) behandelten Zellen (SK-Mel-147), # p<0.05 vs. DN-Empty und * p<0.05 im Zeitverlauf aller Gruppen, Mean±SEM.

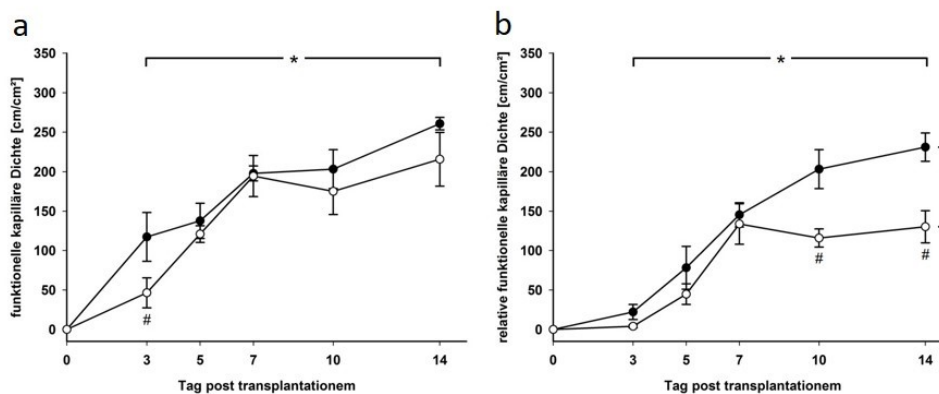


Abb. 28: FCD [cm/cm²] (a) und rFCD [cm/cm²] (b) im Verlauf nach xenogener Transplantation von DN-Empty- (gefüllte Kreise, n=5), DN-VEGFR-3- (leere Kreise, n=5) behandelten Zellen (SK-Mel-147), # p<0.05 vs. DN-Empty, * p<0.05 im Zeitverlauf aller Gruppen und X p<0,05 DN-Empty vs. DN-VEGFR-3 im gesamten Verlauf, Mean±SEM.

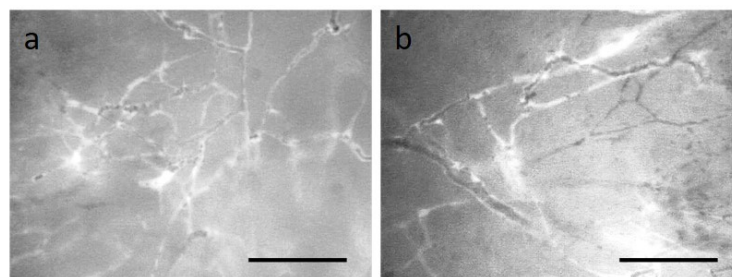


Abb. 29: Intravitalmikroskopische Aufnahme repräsentativer Ausschnitte gefäßtragender Tumorbereiche am 14. Tag. DN-Empty (a), DN-VEGFR-3 (b). Das Plasma wurde mit FITC-Dextran (MW 150 kDa, 2 %, Exzitation_{max}/Emission_{max} λ: 490 nm/520 nm) in Blaulichtepiillumination (λ: 450-490 nm) sichtbar gemacht und somit hell kontrastiert. Eichstriche 100 µm.

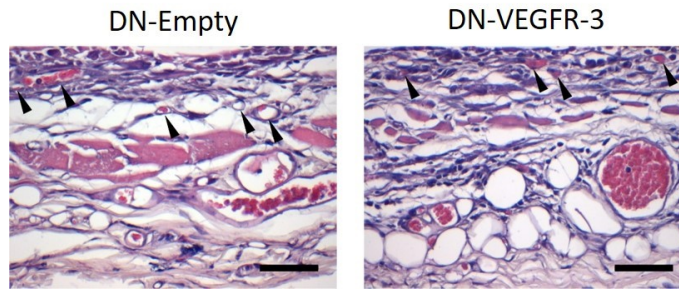


Abb. 30: HE gefärbte Schnitte der Tumore am 14. Tag. Gezeigt sind hier das chaotische Tumorstroma am Übergang zum *Panniculus carnosus* und mit Erythrozyten gefüllte Kapillaren (Pfeilspitzen), Eichstriche 50 μ m.

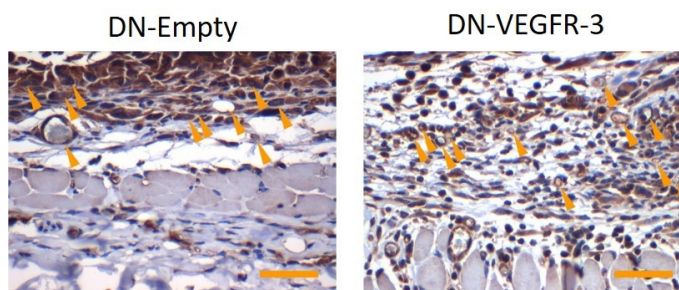


Abb. 31: Immunhistochemie mit Anti-CD31 der Tumore am 14. Tag. Erythrozyten gefüllte Kapillaren mit DAB angefärbtem endothelialem *Coating* (Pfeilspitzen), Eichstriche 50 μ m.

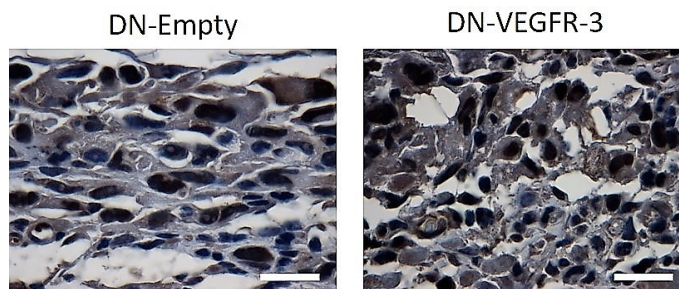


Abb. 32: Immunhistochemie mit Anti-PCNA der Tumore am 14. Tag. Gezeigt ist das chaotische Tumorgewebe. Proliferation (DAB positives Zytoplasma) ist in beiden Behandlungen erhalten, Eichstriche 15 μ m.

3.3 E2F1-Überexpression

Um zu untersuchen, ob der Effekt von e2f1 auf die Neoangiogenese von vegfr-3 abhängig ist, wurden xenogene amelanotische Melanomzellen (SK-Mel-29, 4×10^5 , geringe endogene E2F1-Expression) in dorsale Rückenhautkammern an männlichen Nacktmäusen implantiert. Es kamen vier Versuchsgruppen zum Einsatz: Tumorzellen mit E2F1-

Überexpression (pcDNA3.1-E2F1) und Transfektion mit sh.control (n=2), Tumorzellen mit E2F1-Überexpression (pcDNA3.1-E2F1) und Transfektion mit sh.VEGFR-3 (n=2), oder chemischer vegfr-3-Inaktivierung (MAZ51, n=3) und Kontrolltumorzellen mit Leervektor (pcDNA3.1) und Transfektion mit sh.control (n=8). Die Ausbildung eines frühen Tumorgefäßnetzwerks wurde über 2 Wochen wiederholt mittels Intravitalmikroskopie aufgezeichnet und anschließend offline ausgewertet. Im Anschluss an diese Beobachtungszeit wurden die tumortragenden Hautstücke asserviert und histologisch untersucht.

Die Daten dieses Versuchs lassen auf Grund der geringen Fallzahl lediglich präliminäre Aussagen zu. Die Tumorfläche zeigte eine Tendenz zur Reduktion im Verlauf des Versuchs. Am 3. Tag erreichte die TA im Mittel $22,4 \pm 4,2 \text{ mm}^2$ und reduziert sich zum 14. Tag auf $18,1 \pm 4,2 \text{ mm}^2$ (siehe Abb. 33a, S.44). Die implantierten Xenografts erreichten im Mittel am 10. Tag mit $0,67 \pm 0,05$ die höchste rVTA im Verlauf des Versuchs, diese fiel danach wieder leicht ab. Betrachtet man die rVTA der Kontrolltumore (pcDNA3.1-Empty+sh.control) im Vergleich zur alleinigen E2F1-Überexpression (pcDNA3.1-E2F1+sh.control), so war die rVTA durch E2F1-Überexpression über den gesamten Beobachtungszeitraum der Tendenz nach erhöht. Auch schien die Reduktion von vegfr-3 (E2F1-sh.VEGFR-3 und pcDNA3.1-E2F1+MAZ51) den Effekt der E2F1-Überexpression zumindest teilweise aufzuheben (siehe Abb. 33b, S.44). Betrachtet man die Daten zur FCD, so zeigten sich ähnliche Verhältnisse. Die Kontrollgruppe zeigte am 14. Tag lediglich eine FCD von $166,5 \pm 21,1 \text{ cm/cm}^2$, wohingegen die E2F1-Überexpression am 14. Tag eine FCD von $291,0 \pm 47,0 \text{ cm/cm}^2$ bewirkte. Wurde gleichzeitig mit der E2F1-Überexpression VEGFR-3 auf RNA- oder Proteinebene inaktiviert, resultierten mittlere FCDs von $239,3 \pm 14,7 \text{ cm/cm}^2$ (pcDNA3.1-E2F1+MAZ51) und 219 cm/cm^2 (pcDNA3.1-E2F1-sh.VEGFR-3), die ebenfalls vermuten lassen, dass VEGFR-3-Hemmung die Effekte der E2F1-Überexpression antagonisiert (siehe Abb. 34a, S.44). Noch deutlicher war der Effekt bei der rFCD. Die Kontrolle erreichte am 14. Tag lediglich eine rFCD von $88,5 \pm 27 \text{ cm/cm}^2$, wogegen die E2F1-Überexpression am 14. Tag zu einer rFCD von $231,1 \pm 6,8 \text{ cm/cm}^2$ führte. Reduktion von vegfr-3 hob diesen Effekt teilweise wieder auf. Am 14. Tag nach Doppelbehandlung hatten die Tumore eine rFCD von $164,2 \pm 11,2 \text{ cm/cm}^2$ (pcDNA3.1-E2F1+MAZ51) und $144,4 \text{ cm/cm}^2$ (pcDNA3.1-E2F1-sh.VEGFR-3) (siehe Abb. 34b, S.44). Abb. 35 (S.45) zeigt bei allen Gruppen die für Tumorgefäßnetzwerke typische chaotische Struktur, jedoch je nach Behandlung unterschiedliche Gefäßdichten. Wie erwartet hatten die Kontrolltumore die geringste, die Tumore mit alleiniger E2F1-Überexpression die

höchste und die Tumore bei denen E2F1 überexprimiert, VEGFR-3 hingegen gehemmt wurde, eine mittlere Gefäßdichte.

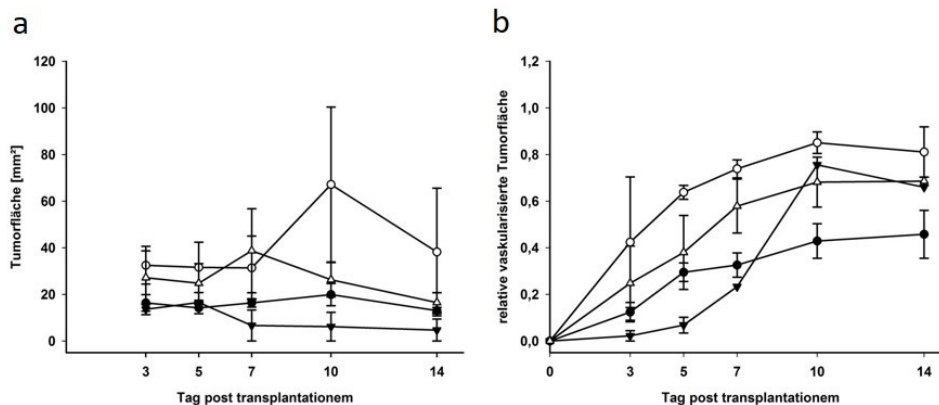


Abb. 33: TA [mm²] (a) und rVTA (b) im Verlauf nach xenogener Transplantation von pcDNA3.1-Empty+sh.control (gefüllte Kreise, n=8), pcDNA3.1-E2F1+sh.control (leere Kreise, n=2), pcDNA3.1-E2F1-sh.VEGFR-3 (gefüllte Dreiecke, n=2) und pcDNA3.1-E2F1+MAZ51 (leere Dreiecke, n=1-2) behandelten Zellen (SK-Mel-29), Mean±SEM.

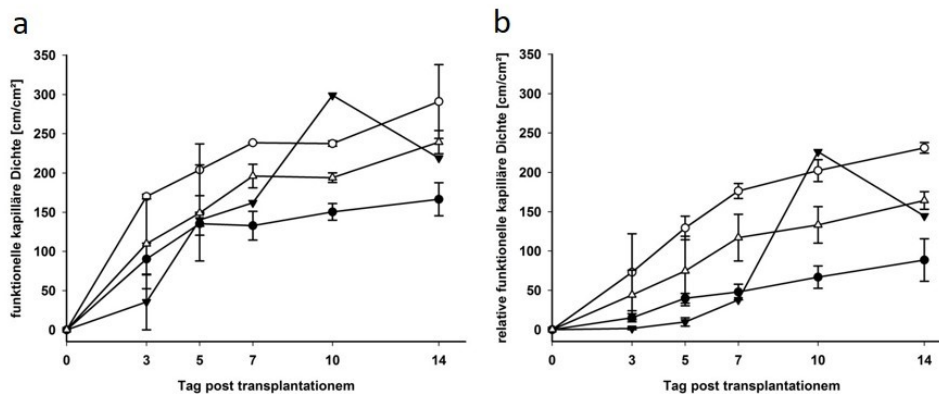


Abb. 34: FCD [cm/cm²] (a) und rFCD [cm/cm²] (b) im Verlauf nach xenogener Transplantation von pcDNA3.1-Empty+sh.control (gefüllte Kreise, n=8), pcDNA3.1-E2F1+sh.control (leere Kreise, n=2), pcDNA3.1-E2F1-sh.VEGFR-3 (gefüllte Dreiecke, n=2) und pcDNA3.1-E2F1+MAZ51 (leere Dreiecke, n=1-2) behandelten Zellen (SK-Mel-29), Mean±SEM.

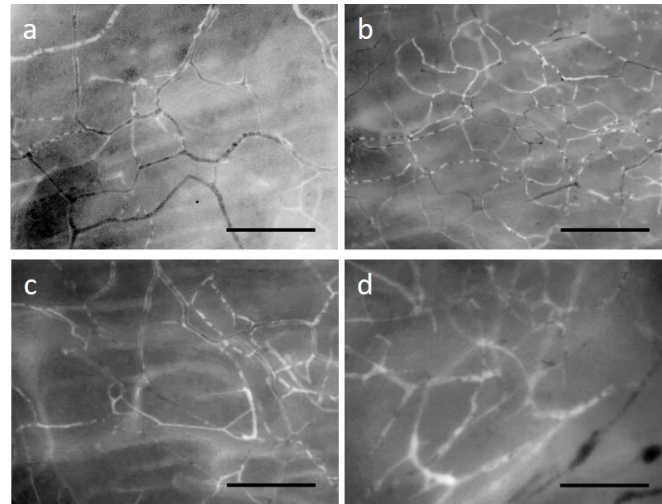


Abb. 35: Intravitalmikroskopische Aufnahme repräsentativer Ausschnitte gefäßtragender Tumorbereiche am 14. Tag. pcDNA3.1-Empty+sh.control (a), pcDNA3.1-E2F1+sh.control (b), pcDNA3.1-E2F1+MAZ51 (c) und pcDNA3.1-E2F1-sh.VEGFR-3 (d). Das Plasma wurde mit FITC-Dextran (MW 150kDa, 2 %, Exzitation_{max}/Emission_{max} λ : 490 nm/520 nm) in Blaulichtepiillumination (λ : 450-490 nm) sichtbar gemacht und somit hell kontrastiert, Eichstriche 100 μ m.

4. Diskussion

4.1 Zu Material und Methoden

4.1.1 Dorsale Rückenhautkammer

Seit der Erstbeschreibung eines Gewebepräparationsverfahrens zur intravitalem Beobachtung von Blutgefäßen und Zellen am lebenden Tier durch Sandison vor fast hundert Jahren (Sandison 1924) wurden zahlreiche Methoden entwickelt. Viele dieser Präparationen erlauben jedoch nur Beobachtungen über wenige Stunden. Die dorsale Rückenhautkammer hingegen ermöglicht, je nach Spezies und Kammerart, die Beobachtung über einen Zeitraum von Tagen bis Wochen (Vajkoczy et al. 2000; Menger et al. 2002), Voraussetzung für die geplante Untersuchung der Tumorangiogenese. Die Präparation einer dorsalen Rückenhautkammer stellt hohe Anforderungen an die Sorgfalt des Experimentators, da bereits kleinste Verletzungen des zu untersuchenden Gewebes zu unerwünschten Heilungsprozessen führen und so das Experiment unbrauchbar machen. Ähnliches gilt für inkomplettes Entfernen des Retraktormuskels und für Blutungen (Sckell und Leunig 2009). Auch kann bereits die Präparation der Kammer allein durch erhöhte Angiopoetin-2-Spiegel mit Untersuchungen der Angiogenese interferieren und das Experiment zunichtemachen (Biel et al. 2014). Um den Einfluss des chirurgischen Traumas zu minimieren, wurden in dieser Arbeit die Tumorzellen erst 3 Tage nach der Präparation transplantiert (Laschke et al. 2011). Kammerpräparate, in denen bereits tumorunabhängige Vaskularisierungsprozesse zu beobachten waren, konnten so ausgeschlossen werden. Der hohe Aufwand, der mit dorsalen Rückenhautkammern verbunden ist, lohnt sich, da dieses Modell neben der chronischen Beobachtung, die orthotope Implantation der Melanomzellen erlaubt. Ektope Tumortransplantate weisen nämlich häufig Probleme beim Anwachsen im Wirtsgewebe auf (Baron et al. 2011).

4.1.2 Untersuchung von Tumorgewebe in Rückenhautkammern

Bis zu einer Größe von etwa 1-3 mm³ können Tumore ohne jegliche Gefäßversorgung heranwachsen (Vajkoczy et al. 2002), doch erst das Erreichen des angiogenen Phänotyps ermöglicht exponentielles Größenwachstum (Folkman 1971; Gimbrone et al. 1972; Li et al. 2012).

Das verwendete Tumormodell ist nur für Mikrotumore bzw. Mikrometastasen anwendbar und untersucht deren angiogenes Potential (Vajkoczy et al. 2002). Geht die Tumorgöße darüber hinaus, lässt sich nicht mehr unterscheiden, ob das Tumorwachstum durch die Neoangiogenese beeinflusst wird oder *vice versa*. In dieser Studie ergaben sich keine relevanten Unterschiede in der resultierenden TA, sodass diese den Unterschied der Vaskularisierung nicht erklären können.

Schon sehr kleine Tumorzellaggregate von nur 100-300 Zellen können Neoangiogenese initiieren, sobald sie das sogenannte angiogene Stadium erreicht haben (Li et al. 2000). Die in dieser Arbeit verwendete Zellzahl von etwa 4×10^5 war somit mehr als ausreichend. Die resultierenden Tumore ließen sich in der sonst klaren Rückenhautkammer leicht identifizieren und wiederholt aufsuchen.

4.1.2 Versuchstiere

Um humane Tumorzellen xenogen in Mäuse transplantieren zu können, mussten immundefiziente Tiere zum Einsatz kommen. Weil sie keine T-Zellen ausbilden, die die körperfremden Zellen identifizieren könnten, eignen sich Nacktmäuse (NMRI nu/nu) hervorragend für diesen Zweck (Lehr et al. 1993). Diese Tiere sind homozygot für ein defektes *Foxn1*, welches ausschließlich in epithelialen Zellen des Thymus und der Kutis exprimiert wird und für deren Entwicklung und Differenzierung essentiell ist. Die homozygoten Tiere erscheinen daher im Phänotyp auf Grund der defekten Haarfollikel nackt (Mecklenburg et al. 2005) und entwickeln eine alymphoide zystische Thymusdysgenese, welche einen primären T-Zellimmundefekt mit sich bringt (Palamaro et al. 2014). Wegen der fehlenden adaptiven Fremdzellabwehr eignen sich diese Mäuse als Rezipienten für allogene und xenogene Transplantationsversuche (Shultz 1991). Allerdings beschränkt die überelastische Haut dieser Tiere die Untersuchungsdauer der dorsalen Rückenhautkammer auf etwa 3 Wochen. Somit ist mit diesem Modell keine Aussage zur längerfristigen biologischen Konsequenz des durch die Behandlungen veränderten Gefäßwachstums möglich. In dieser Studie wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, um Effekte von zyklusbedingten Hormonschwankungen auf die Neoangiogenese auszuschließen.

4.1.3 Intravitale Epifluoreszenz-Videomikroskopie

Es gibt eine Vielzahl von Methoden, Gewebe zu untersuchen. Mittels Histologie und Molekularbiologie lassen sich qualitative und quantitative Aussagen auf zellulärer, subzellulärer und molekularer Ebene treffen. Diese genannten Verfahren sind invasiv und statisch. Typische bildgebende Verfahren, welche sich am lebenden Organismus durchführen lassen, wie die Positronen-Emission-Tomographie, die Computertomographie oder die Magnet-Resonanztomographie, weisen hingegen ein begrenztes räumliches und zeitliches Auflösungsvermögen auf. Dagegen ermöglicht die Lichtmikroskopie, besonders wenn sie durch Fluoreszenzfärbungen unterstützt wird, auch beim lebenden Organismus eine sehr hohe räumliche und zeitliche Auflösung. Die Epifluoreszenzmikroskopie ermöglicht die Darstellung von Gewebestrukturen, wenn diese mittels Fluoreszenzfarbstoffen spezifisch markiert wurden. Werden Marker mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, lassen sich im selben Bildausschnitt mit den passenden Filtern verschiedene Strukturen darstellen. Allerdings kann das Gewebe im beleuchteten Bereich durch phototoxische Effekte der verwendeten Farbstoffe Schaden nehmen (Rumbaut et al. 2005). Die Gewebepenetration bei der Epifluoreszenzmikroskopie ist auf etwa 100 µm begrenzt. Höhere Penetrationstiefen lassen sich durch modernere Verfahren, wie der Multiphotonen-Laserscanning-Mikroskopie und der optischen Kohärenztomographie erreichen. Auch für diese Verfahren gibt es eine faszinierende Vielzahl von optischen Markern, die verschiedenste Moleküle markieren und so nachweisbar machen (Fukumura et al. 2010).

Eine Kombination von Epifluoreszenz, Lichtmikroskopie und *in vivo* Datenaufnahme vereint die Vorteile der genannten Methoden und hat sich für die Untersuchung biologischer Vorgänge in Zellen und Geweben, nicht zuletzt auch in Tumorgewebe besonders bewährt (Vajkoczy et al. 2000; Fukumura et al. 2010).

4.1.4 Fluoreszenzfarbstoff

Bei dieser Studie wurde zur Gefäßkontrastierung 0,1 ml 2 % FITC-Dextran (MW 150 kDa) verwendet. Lokale Lichtanregung dieses Fluoreszenzfarbstoffes setzt reaktive Sauerstoffradikale frei, die phototoxisch auf das Gewebe wirken. Dieser Effekt wird unter anderem gezielt zur Thrombusbildung in Arteriolen und Venolen eingesetzt (Herrmann 1983; Saniabadi et al. 1995). In dieser Arbeit musste der schädigende Effekt jedoch

minimiert und dafür die Menge des applizierten Fluoreszenzfarbstoffs sowie die Lichtenergie soweit möglich reduziert werden (Rumbaut et al. 2005).

Dextrane sind Polysaccharide, die unterschiedliche pharmakodynamische und pharmakokinetische Eigenschaften in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße aufweisen. Sie sind auf Grund der vielen Hydroxylgruppen hydrophil und lassen sich gut mit verschiedenen Molekülen konjugieren. Kleine Dextrane bis etwa 40 kDa werden schnell über die Nieren eliminiert, größere Moleküle hingegen vorwiegend in Leber und Milz angereichert und abgebaut (Mehvar 2000). FITC-Dextran mit einer Masse von 70 kDa diffundiert auch in gesundem Gewebe recht schnell aus dem Plasma in umgebendes Gewebe (Reeves et al. 2012). Aus diesem Grund wurde in dieser Studie ein Dextran-Farbstoffkonjugat mit hohem Molekulargewicht (150 kDa) eingesetzt und so der Übertritt in den Extravasaalraum verhindert und die glomeruläre Filtration vermieden.

4.2 Zu den Ergebnissen

4.2.1 Neoangiogenese

In dieser Studie sollten die Effekte des Transkriptionsfaktors e2f1 und seines Zielgens VEGFR-3 auf die Formierung eines frühen Tumorgefäßnetzwerkes *in vivo* untersucht werden.

Tumorgewebe besteht aus einem komplexen Verbund verschiedenster Zelltypen. Auch die Tumorzellen innerhalb eines Tumors weisen unterschiedliche Eigenschaften auf (Hanahan und Weinberg 2011). Es verwundert also nicht, wenn Tumore auch inhomogen vaskularisieren. Die in dieser Arbeit in die Rückenhautkammern eingebrachten Tumorzellen bilden anfangs noch kein klassisches Tumorgewebe (Hanahan und Weinberg 2011). Die dafür nötigen Stromazellen und Vorläuferzellen für die tumorversorgenden Blutgefäße müssen erst vom Empfängergerewebe in das Tumorgewebe einwandern. Die rVTA bildet ein Maß für die Geschwindigkeit der Neoangiogenese. Ebenso hat die resultierende FCD eine gute Aussagekraft bezüglich der Effektivität der Neoangiogenese (Jain et al. 1998; Vajkoczy et al. 2000). Diese beiden Parameter sollten gemeinsam betrachtet werden, wie es in der Arbeitsgruppe bewährt war (Vollmar et al. 2001). In dieser Arbeit wurde zusätzlich der Faktor aus FCD und rVTA gebildet, um einen Vergleichsparameter für die Neoangiogenese zu erhalten, der robust gegenüber der Inhomogenität des Vaskularisierungsmusters ist.

Nach Knockdown von E2F1 in den verwendeten hochaggressiven amelanotischen Melanomzellen zeigte sich bereits makroskopisch eine deutliche Reduktion der Neovaskularisierung. Die intravitalmikroskopische Auswertung bestätigte diesen ersten Eindruck. Die Kontrolltumore und Behandlungsgruppe vaskularisierten mit vergleichbarer Geschwindigkeit, jedoch reduzierte sich durch den Knockdown von E2F1 die resultierende funktionelle Gefäßdichte. Dies zeigt, dass der Transkriptionsfaktor e2f1 in den hier untersuchten Tumorzellen einen wichtigen Beitrag zur Stimulation der Neoangiogenese leistet. e2f1 scheint keinen Einfluss auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit von neuen Gefäßen in Mikrometastasen zu haben, sondern vielmehr auf deren Vernetzung.

Ähnliches zeigte sich bei Knockdown von VEGFR-3 und Inaktivierung von vegfr-3. Jedoch ergab sich in diesem Fall neben der verminderten FCD, auch eine Reduktion der rVTA. Vermindertes vegfr-3 scheint somit nicht nur die Gefäßnetzbildung, sondern auch die radiale Ausbreitung der neuen Gefäße zu beeinträchtigen. Einige Tumore koexprimieren VEGFR-3 und dessen Liganden VEGF-C und bilden so einen positiven Feedback-Loop (Su et al. 2007; Kurenova et al. 2009). Die deutliche Reduktion der Neoangiogenese durch vegfr-3-Reduktion könnte durch Hemmung dieses Autostimulationswegs durch Inaktivierung von VEGFR-3 begründet sein. Der stärkere Effekt im Vergleich mit dem E2F1-Knockdown könnte sich dadurch erklären lassen, dass VEGFR-3 als Downstream-Zielgen weniger Kompensationsmöglichkeiten als E2F1 aufweist.

Andere Gruppen konnten mit intravitalmikroskopischen Studien mit Rückenhautkammern zeigen, dass ausbleibende Vaskularisierung zur Limitierung der Tumorgroße führt. So blieben zum Beispiel Tumore eines Rhabdomyosarkoms auf eine Tumorofläche von etwa 2 mm² begrenzt, wenn die Neoangiogenese durch einen Antikörper gegen vegf (A4.6.1, Bevacizumab) inhibiert wurden (Borgstrom et al. 1996). Auch zeigen Nierenkarzinomzellen durch antiangiogene Behandlung mit Sunitinib, einem Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor, geringeres Größenwachstum und mangelhafte Oxygenierung (Biel et al. 2014). Allerdings ist Tumorwachstum bzw. -überleben oft noch bei sehr niedrigem Sauerstoffpartialdruck möglich (Dewhirst et al. 1999). Bereiche, welche weiter als 70-100 µm von versorgenden Gefäßen entfernt liegen, sind hypoxisch, doch erst wenn Tumorzellen noch weiter entfernt sind, werden sie nekrotisch (Yeom et al. 2012). Dies entspräche einer minimalen funktionellen Gefäßdichte von unter 50-70 cm/cm², die notwendig wäre, um die beschriebenen hypoxischen Bereiche zu verursachen. In dieser Studie erreichte die FCD in allen Gruppen diese Werte bereits ab dem 3. Tag und überschritt sie deutlich ab dem 5. Tag. Diese Gefäßreserve kann erklären, weshalb in dieser Studie einer Verringerung

der FCD die Tumorausdehnung im Vergleich zur Kontrolle nicht weiter reduzierte. Gleichwohl nahm die Tumorfläche im späteren Verlauf des Experiments tendenziell ab. Die erste Vermutung lautete Zelltod, doch zeigte die durchgeführte Histologie noch am 14. Tag vitales Tumorgewebe. In einer vorangegangenen Studie von Alla et al. erzeugte der Knockdown von E2F1 in SK-Mel-147 ebenfalls keine Änderung der Proliferation und des Tumorwachstums (Alla et al. 2010). So ist wohl davon auszugehen, dass Gewebsuntergang für die Flächenabnahme nicht verantwortlich war. Wahrscheinlicher erscheint die Ausbildung von echtem Tumorgewebe und der damit verbundenen Retraktion und Dickenzunahme. Tumorgewebe bildet durch einwachsendes Tumorstroma einen festen Verbund, welcher interstitiellen Drücken von bis zu 100 mmHg widerstehen kann (Stylianopoulos et al. 2013). Im Gegensatz zum E2F1-Knockdown bewirkte die E2F1-Überexpression *in vivo* eine Zunahme der Neoangiogenese. Auch wenn dieses Ergebnis nur durch preliminäre Daten gestützt ist, erscheint es plausibel und passt ins Bild. Auch ließ sich dieser Effekt in einem Pilotexperiment durch die Inaktivierung bzw. den Knockdown von VEGFR-3 zu einem großen Teil aufheben. Dies unterstützt die Vorstellung, dass VEGFR-3 ein Zielgen von e2f1 ist, und dass der Signalweg eine wichtige Rolle in der Regulation der Neoangiogenese spielt. Die Daten der Pilotexperimente unterstützten somit die Hauptergebnisse dieser Arbeit. Es war aus Zeitgründen leider nicht möglich, die aufwendigen und schwierigen Experimente zur Wirkung der E2F1-Überexpression zu wiederholen.

Die in dieser Studie gezeigten intravitalen Effekte bestätigten die Schlussfolgerung, die Kollegen der Arbeitsgruppe aus ihren vorangegangenen *in vitro* Versuchen gezogen hatten und lassen weiterführende Aussagen zu, so dass sich folgendes Gesamtbild ergibt: e2f1 verstärkt die Expression proangiogener Moleküle, wahrscheinlich über die Förderung eines vegf-c/vegfr-3-Feedback-Loops, und leistet so einen profunden Beitrag zur Neoangiogenese bei Neoplasien (Engelmann et al. 2013).

Da die Gefäßversorgung nicht nur Grundlage für Größenwachstum ist, sondern auch die Invasivität und Metastasierung bestimmt (Hanahan und Folkman 1996; Hanahan und Weinberg 2011), könnte die durch e2f1 angekurbelte Neoangiogenese bei E2F1-überexpimierenden Neoplasien eine Erklärung für die gesteigerte Metastasierung und Invasivität und damit für die schlechte Prognose von Patienten liefern (Alla et al. 2010; Engelmann und Pützer 2012). Falls dies zutrifft, könnte die Hemmung der E2F1-Überexpression und/oder der Wirkung dieses Transkriptionsfaktors einen antiangiogenen gefäßnormalisierenden Therapieansatz bieten. Es würde sich lohnen,

dies in einer Langzeit-Untersuchung mit subkutan eingebrachten Tumorzellen zu evaluieren und so den nächsten Schritt zu einer möglichen klinischen Anwendung als *targeted Therapies* zu machen.

5. Zusammenfassung

Die Therapie von Neoplasien, insbesondere von weit fortgeschrittenen malignen Tumoren gestaltet sich äußerst schwierig. Bei Tumoren in späten Krankheitsstadien sind unsere Therapiemöglichkeiten oft limitiert. In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue Therapieansätze entwickelt und auch mit Erfolg in die Klinik integriert. Neue *targeted Therapies* können bereits vielen Patienten helfen. Essentiell für die Entwicklung solcher Therapien ist ein profundes Verständnis der Neoangiogenese und der Interaktion entarteter Zellen mit dem gesunden Gewebe, was sich nur mit realitätsnahen Modellen zur Untersuchung der biologischen Effekte möglicher Therapeutika bzw. Behandlungen erreichen lässt.

Der Transkriptionsfaktor *e2f1* und eines seiner Zielgene, der Oberflächenrezeptor VEGFR-3, werden als mögliche Promotoren von Tumorerkrankungen diskutiert. Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch unklar. In der vorliegenden Studie sollten die Effekte von *e2f1* und *vegfr-3* in amelanotischen Melanomzellen auf die Bildung eines frühen Tumorgefäßnetzes untersucht werden. Dafür wurden humane amelanotische Melanomzellen xenogen und orthotop in immundefiziente Mäuse transplantiert. Als Modell wurde die dorsale Rückenhautkammer an der Nacktmaus eingesetzt, um die Initialphase der Neovaskularisierung mit Intravitalmikroskopie *in vivo* zu untersuchen. Dieses Modell ermöglicht neben der Darstellung der Gefäßanatomie auch die Untersuchung der Funktionalität von Mikrogefäßen.

Ein Knockdown von E2F1 reduzierte die Dichte von funktionellen Mikrogefäßen im entstehenden frühen Tumorgefäßnetz der amelanotischen Melanomzellen. Ähnlich wirkte sich eine Reduktion von *vegfr-3* in den Tumorzellen aus. Zusätzlich war hier die Dynamik der Neoangiogenese gebremst. Darüber hinaus deuteten erste Daten darauf hin, dass sich die funktionelle Gefäßdichte im Tumorstroma bei gering invasiven Melanomen durch ein Überangebot von *e2f1* in den entarteten Zellen anheben lässt. Dieser Effekt ließ sich in ersten Tests durch Reduktion von *vegfr-3* in den Tumorzellen weitgehend unterdrücken.

Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass E2F1 in humanen Melanomzellen die Neoangiogenese und Tumorprogression steigert. Der Oberflächenrezeptor *vegfr-3* wird physiologisch auf Lymphendothelzellen exprimiert. In den untersuchten Tumorzellen hatte *vegfr-3* ebenfalls einen proangiogenen Effekt, neben seiner bekannten Rolle in der Lymphangiogenese. Die Untersuchung legte weiterhin nahe, dass die positive *e2f1*-Wirkung auf die Neoangiogenese zu einem großen Teil durch *vegfr-3* vermittelt wird.

Eingriffe in diesen Autoregulationsmechanismus könnten profunde Effekte auf das komplexe Tumorgewebe und die Tumorprogression haben. Darin liegen Chancen für die Entwicklung gezielter Therapiestrategien.

III. Literaturverzeichnis

Abdollahi, Amir; Folkman, Judah. **Evading tumor evasion: Current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy.** *Drug Resist Updat.* 2010; 13 (1-2): 16–28.

Ahn, G-One; Brown, J. Martin. **Role of endothelial progenitors and other bone marrow-derived cells in the development of the tumor vasculature.** *Angiogenesis.* 2009; 12 (2): 159–164.

Algire, Glenn H. **An Adaption of the Transparent- Chamber Techique to the Mouse.** *J Natl Cancer Inst.* 1943; 4 (1): 1–11.

Alla, Vijay; Engelmann, David; Niemetz, Annett; Pahnke, Jens; Schmidt, Anke; Kunz, Manfred et al. **E2F1 in Melanoma Progression and Metastasis.** *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102 (2): 127–133.

American Cancer Society. 2012. **The History of Cancer.** Hg. v. American Cancer Society.

Asahara, Takayuki; Takahashi, Tomono; Masuda, Haruchika; Kalka, Christoph; Chen, Donghui; Iwaguro, Hideki et al. **VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells.** *EMBO J.* 1999; 18 (14): 3964–3972.

Ausprunk, D. H.; Folkman, Judah. **Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis.** *Microvasc Res.* 1977; 14 (1): 53–65.

Baron, Veronique T.; Welsh, John; Abedinpour, Parisa; Borgstrom, Per. **Intravital microscopy in the mouse dorsal chamber model for the study of solid tumors.** *Am J Cancer Res.* 2011; (5): 674–686.

Biel, Nikolett M.; Lee, Jennifer A.; Sorg, Brian S.; Siemann, Dietmar W. **Limitations of the dorsal skinfold window chamber model in evaluating anti-angiogenic therapy during early phase of angiogenesis.** *Vasc Cell.* 2014; 6: 17.

Borgstrom, P.; Hillan, K. J.; Sriramaraio, P.; Ferrara, N. **Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody.** Novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Res.* 1996; 56 (17): 4032–4039.

Brown, Edward; Munn, Lance L.; Fukumura, Dai; Jain, Rakesh K. **In Vivo Imaging of Tumors.** *Cold Spring Harb Protoc.* 2010; (7): pdb.prot5452.

Bug, M.; Dobbstein, M. **Anthracyclines induce the accumulation of mutant p53 through E2F1-dependent and -independent mechanisms.** *Oncogene.* 2011; 30 (33): 3612–3624.

Cang, Shundong; Mukhi, Nikhil; Wang, Kemeng; Liu, Delong. **Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy.** *J Hematol Oncol.* 2012; 5 (1): 64.

Carmeliet, Peter. **Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.** *Nat Med.* 2000; 6 (4): 389–395.

Carmeliet, Peter; Jain, Rakesh K. **Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases.** *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10 (6): 417–427.

- Chen, Hui-Zi; Tsai, Shih-Yin; Leone, Gustavo. **Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control.** *Nat Rev Cancer*. 2009; 9 (11): 785–797.
- Chien, M.-H; Ku, C.-C; Johansson, G.; Chen, M.-W; Hsiao, M.; Su, Jen-Liang et al. **Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) promotes angiogenesis by induction of COX-2 in leukemic cells via the VEGF-R3/JNK/AP-1 pathway.** *Carcinogenesis*. 2009; 30 (12): 2005–2013.
- Cross, Daenna; Burmester, James K. **Gene Therapie for Cancer Treatment: Past, Present and Future.** *Clin Med Res*. 2006; 4 (3): 218–227.
- Dewhirst, M. W.; Ong, E. T.; Braun, R. D.; Smith, B.; Klitzman, B.; Evans, S. M.; Wilson, D. **Quantification of longitudinal tissue pO₂ gradients in window chamber tumours. Impact on tumour hypoxia.** *Br J Cancer*. 1999; 79 (11-12): 1717–1722.
- Dey, Nandini; De, Pradip; Brian, Leyland-Jones. **Evading anti-angiogenic therapy. Resistance to anti-angiogenic therapy in solid tumors.** *Am J Transl Res*. 2015; 7 (10): 1675–1698.
- Döme, Balázs; Hendrix, Mary J. C.; Paku, Sándor; Tóvári, József; Tímár, József. **Alternative Vascularization Mechanisms in Cancer.** *Am J Pathol*. 2007; 170 (1): 1–15.
- Dyson, N. **The regulation of E2F by pRB-family proteins.** *Genes Dev*. 1998; 12 (15): 2245–2262.
- Eichhorn, Martin E.; Kleespies, A.; Angele, M. K.; Jauch, K-W; Bruns, C. J. **Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact.** *Langenbecks Arch Surg*. 2007; 392 (3): 371–379.
- Engelmann, David; Mayoli-Nussle, D.; Mayrhofer, Christian; Furst, K.; Alla, Vijay; Stoll, Anja et al. **E2F1 promotes angiogenesis through the VEGF-C/VEGFR-3 axis in a feedback loop for cooperative induction of PDGF-B.** *J Mol Cell Biol*. 2013; 5 (6): 391–403.
- Engelmann, David; Pützer, Brigitte M. **Translating DNA damage into cancer cell death-A roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance.** *Drug Resist Updat*. 2010; 13 (4-5): 119–131.
- Engelmann, David; Pützer, Brigitte M. **The dark side of E2F1: in transit beyond apoptosis.** *Cancer Res*. 2012; 72 (3): 571–575.
- Epstein, Joel B.; Thariat, Juliette; Bensadoun, Rene-Jean; Barasch, Andrei; Murphy, Barbara A.; Kolnick, Leanne et al. **Oral complications of cancer and cancer therapy.** *CA Cancer J Clin*. 2012; 62 (6): 400–422.
- Fiedler, Walter; Gehling, Ursula; Mende, Thorsten; Hossfeld, Dieter K. **Neoangiogenese und Tumorwachstum.** Pathophysiologie und neue therapeutische Ansätze. *Dtsch Arztebl Ausg A*. 2001; 98 (21): A 1392–1394.
- Flister, Michael J.; Wilber, Andrew; Hall, Kelly L.; Iwata, Caname; Miyazono, Kohei; Nisato, Riccardo E. et al. **Inflammation induces lymphangiogenesis through up-regulation of VEGFR-3 mediated by NF-kappaB and Prox1.** *Blood*. 2010; 115 (2): 418–429.
- Folberg, Robert; Hendrix, Mary J. C.; Maniotis, Andrew J. **Vasculogenic Mimicry and Tumor Angiogenesis.** *Am J Pathol*. 2000; 156 (2): 361–381.
- Folkman, Judah. **Tumor angiogenesis: therapeutic implications.** *N Engl J Med*. 1971; 285 (21): 1182–1186.

- Fukumura, Dai; Duda, Dan G.; Munn, Lance L.; Jain, Rakesh K. **Tumor Microvasculature and Microenvironment: Novel Insights Through Intravital Imaging in Pre-Clinical Models.** *Microcirculation*. 2010; 17 (3): 206–225.
- Gimbrone, Michael A.; Leapman, Stephens B.; Cotran, Ramzi S.; Folkman, Judah. **Tumor Dormancy in vivo by Prevention of Neovascularization.** *J Exp Med*. 1972; 136 (2): 261–276.
- Goel, Hira Lal; Mercurio, Arthur M. **VEGF targets the tumour cell.** *Nat Rev Cancer*. 2013; 13 (12): 871–882.
- Grimm, Jan; Scheinberg, David A. **Will Nanotechnology Influence Targeted Cancer Therapy?** *Semin Radiat Oncol*. 2011; 21 (2): 80–87.
- Hajdu, Steven I. **A note from history.** Landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*. 2011a; 117 (5): 1097–1102.
- Hajdu, Steven I. **A note from history.** Landmarks in history of cancer, part 2. *Cancer*. 2011b; 117 (12): 2811–2820.
- Han, Sehwan; Park, Kyeongmee; Bae, Byung-Noe. **E2F1 Expression is Related with the Poor Survival of Lymph Node-positive Breast Cancer Patients Treated with Fluorouracil, Doxorubicin and Cyclophosphamide.** *Breast Cancer Res Treat*. 2003; 82 (1): 11–16.
- Hanahan, Douglas; Folkman, Judah. **Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.** *Cell*. 1996; 86 (3): 353–364.
- Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. **The Hallmarks of Cancer.** *Cell*. 2000; 100 (1): 57–70.
- Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation.** *Cell*. 2011; 144 (5): 646–674.
- Herrmann, K. S. **Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran.** *Microvasc Res*. 1983; 26 (2): 238–249.
- Holash, J. **Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF.** *Science*. 1999; 284 (5422): 1994–1998.
- Imai, Miwa Akasofu; Oda, Yoshio; Oda, Makoto; Nakanishi, Isao; Kawahara, Ei. **Overexpression of E2F1 associated with LOH at RB locus and hyperphosphorylation of RB in non-small cell lung carcinoma.** *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004; 130 (6): 320–326.
- Jain, R. K.; Safabakhsh, N.; Sckell, A.; Chen, Y.; Jiang, P.; Benjamin, L. et al. **Endothelial cell death, angiogenesis, and microvascular function after castration in an androgen-dependent tumor.** Role of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95 (18): 10820–10825.
- John, K.; Alla, Vijay; Meier, C.; Pützer, Brigitte M. **GRAMD4 mimics p53 and mediates the apoptotic function of p73 at mitochondria.** *Cell Death Differ*. 2010; 18 (5): 874–886.
- Khalil, Danny N.; Smith, Eric L.; Brentjens, Renier J.; Wolchok, Jedd D. **The future of cancer treatment.** Immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016; 13 (5): 273–290.

- Kim, Soo Jung; Jung, Kyung Hee; Son, Mi Kwon; Park, Jung Hee; Yan, Hong Hua; Fang, Zhenghuan et al. **Tumor vessel normalization by the PI3K inhibitor HS-173 enhances drug delivery.** *Cancer letters*. 2017; 403: 339–353.
- Kirkin, Vladimir; Thiele, Wilko; Baumann, Petra; Mazitschek, Ralph; Rohde, Katrin; Fellbrich, Guido et al. **MAZ51, an indolinone that inhibits endothelial cell and tumor cell growth in vitro, suppresses tumor growth in vivo.** *Int J Cancer*. 2004; 112 (6): 986–993.
- Klener, P., JR.; Klener, P. **Molecularly-Targeted and Biological Anti-Cancer Therapy.** *Folia Biol (Praha)*. 2012; 58 (1): 1–6.
- Koch, Sina; Tugues, Sònia; Li, Xiujuan; Gualandi, Laura; Claesson-Welsh, Lena. **Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors.** *The Biochemical journal*. 2011; 437 (2): 169–183.
- Kong, Deok-Hoon; Kim, Mi Ra; Jang, Ji Hye; Na, Hee-Jun; Lee, Sukmook. **A Review of Anti-Angiogenic Targets for Monoclonal Antibody Cancer Therapy.** *Int J Mol Med*. 2017; 18 (8): 1786.
- Kovesdi, Imre; Reichel Ronald; Nevins, Joseph R. **Role of an adenovirus E2 promotor binding factor in E1A- mediated coordinate gene control.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84 (8): 2180–2184.
- Kurenova, Elena V.; Hunt, Darrel L.; He, Dijua; Massoll, Nicole A.; Golubovskaya, Vita M.; Garces, Christopher A.; Cance, William G. **Vascular endothelial growth factor receptor-3 promotes breast cancer cell proliferation, motility and survival in vitro and tumor formation in vivo.** *Cell Cycle*. 2009; 8 (14): 2266–2280.
- Kurz; Burri; Djonov. **Angiogenesis and Vascular Remodeling by Intussusception: From Form to Function.** *News Physiol Sci*. 2003; 18: 65–70.
- Laschke, Matthias W.; Vollmar, Brigitte; Menger, Michael D. **The Dorsal Skinfold Chamber: Window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue.** *Eur Cell Mater*. 2011; 22: 147–167.
- Lee, Ju-Seog; Leem, Sun-Hee; Kim, Sang-Cheol; Park, Eun-Sung; Kim, Sang-Bae Kim Seon-Kyu; Kim, Yong-June et al. **Expression Signature of E2F1 and Its Associated Genes Predict Superficial to Invasive Progression of Bladder Tumors.** *J Clin Oncol*. 2010; 28 (16): 2660–2667.
- Lehr, H. A.; Leunig, Michael; Menger, Michael D.; Nolte, Dirk; Messmer, Konrad. **Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice.** *Am J Pathol*. 1993; 143 (4): 1055–1062.
- Leuci, V.; Maione, F.; Rotolo, R.; Giraudo, E.; Sassi, F.; Migliardi, G. et al. **Lenalidomide normalizes tumor vessels in colorectal cancer improving chemotherapy activity.** *J Transl Med*. 2016; 14 (1): 119.
- Leunig, Michael; Fan Yuan; Menger, Michael D.; Boucher, Yves.; Goetz, Alwin E.; Konrad Messmer; Jain, Rakesh K. **Angiogenesis, Microvascular Architecture, Microhemodynamics, and Interstitial Fluid Pressure during Early Growth of Human Adenocarcinoma LS174T in SCID Mice.** *Cancer Res*. 1992; 52 (23): 6553–6560.
- Li, C. Y.; Shan, S.; Huang, Q.; Braun, R. D.; Lanzen, J.; Hu, K. et al. **Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis.** Evaluation via skin window chambers in rodent models. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92 (2): 143–147.

- Li, Shiqing; Li, Tao; Luo, Yan; Yu, Honghua; Sun, Yuying; Zhou, Huanjiao et al. **Retro-orbital injection of FITC-dextran is an effective and economical method for observing mouse retinal vessels.** *Mol Vis.* 2011; 17: 3566–3573.
- Li, William W.; Li, Vincent W.; Hutnik, Michelle; Chiou, Albert S. **Tumor angiogenesis as a target for dietary cancer prevention.** *J Oncol.* 2012; 2012: 879623.
- Lunt, Sarah Jane; Gray, Colin; Reyes-Aldasoro, Constantino Carlos; Matcher, Stephen J.; Tozer, Gillian M. **Application of intravital microscopy in studies of tumor microcirculation.** *J. Biomed. Opt.* 2010; 15 (1): 11113.
- Maniotis, Andrew J.; Folberg, Robert; Hess, Angela R.; Seftor, E. A.; Gardner, Lynn M. G.; Pe'er, J. et al. **Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry.** *Am J Pathol.* 1999; 155 (3): 739–752.
- Mansoori, Behzad; Sandoghchian Shotorbani, Siamak; Baradaran, Behzad. **RNA Interference and its Role in Cancer Therapy.** *Adv Pharm Bull.* 2014; 4 (4): 313–321.
- Mecklenburg, Lars; Tyhsen, Birte; Paus, Ralf. **Learning from nudity: lessons from the nude phenotype.** *Exp Dermatol.* 2005; 14 (11): 797–810.
- Mehvar, R. **Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents.** *J Control Release.* 2000; 69 (1): 1–25.
- Menger, Michael D.; Laschke, Matthias W.; Vollmar, Brigitte. **Viewing the microcirculation through the window.** Some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res.* 2002; 34 (1-2): 83–91.
- Montañez, Raúl; Sánchez-Jiménez, Francisca; Quesada, Ana R.; Medina, Miguel Ángel. **Exploring and challenging the network of angiogenesis.** *Sci Rep.* 2011; 1 (61): 1–6.
- Moore, Chris B.; Guthrie, Elizabeth H.; Huang, Max Tze-Han; Taxman, Debra J. **Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown.** *Methods Mol Biol.* 2010; 629: 141–158.
- Nahle, Zaher; Polakoff, Julia; Davuluri, Ramana V.; McCurrach, Mila E.; Jacobson, Matthew D.; Narita, Masashi et al. **Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F.** *Nat Cell Biol.* 2002; 4 (11): 859–864.
- Naumov, George N.; Folkman, Judah; Straume, Oddbjorn; Akslen, Lars A. **Tumor-vascular interactions and tumor dormancy.** *APMIS.* 2008; 116 (7-8): 569–585.
- Nevins, Joseph R. **E2F: A Link between the RP Tumor Suppressor Protein and Viral Oncoproteins.** *Science.* 1992; 258 (5081): 424–429.
- Paddison, Patrick J.; Caudy, Amy A.; Bernstein, Emily; Hannon, Gregory J.; Conklin, Douglas S. **Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells.** *Genes Dev.* 2002; 16 (8): 948–958.
- Palamaro, Loredana; Romano, Rosa; Fusco, Anna; Giardino, Giuliana; Gallo, Vera; Pignata, Claudio. **FOXN1 in organ development and human diseases.** *Int Rev Immunol.* 2014; 33 (2): 83–93.
- Polager, Shirley; Ginsberg, Doron. **p53 and E2f: partners in life and death.** *Nat Rev Cancer.* 2009; 9 (10): 738–748.
- Prezioso, L.; Tanzi, S. **Cancer Treatment-Induced Cardiotoxicity: a Cardiac Stem Cell Disease?** *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2010; 8 (1): 55–75.

- Quesada, Ana R.; Medina, Miguel Ángel; Alba, Emilio. **Playing only one instrument may be not enough: Limitations and future of the antiangiogenic treatment of cancer.** *Bioessays*. 2007; 29 (11): 1159–1168.
- Reeves, Kimberley J.; Brookes, Zoë L. S.; Reed, Malcolm W. R.; Brown, Nicola J. **Evaluation of fluorescent plasma markers for in vivo microscopy of the microcirculation.** *J Vasc Res*. 2012; 49 (2): 132–143.
- Reth, Michael. **Immunodeficiency: Trapping the nude mouse gene.** *Curr Biol*. 1995; 5 (1): 18–20.
- Rumbaut, Rolando E.; Slaff, Dick W.; Burns, Alan R. **Microvascular thrombosis models in venules and arterioles in vivo.** *Microcirculation*. 2005; 12 (3): 259–274.
- Sacha, Tomasz. **Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia: an Overview.** *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013; 6 (1): e2014007.
- Samant, Rajeev S.; Shevde, Lalita A. **Recent Advances in Anti-Angiogenic Therapy of Cancer.** *Oncotarget*. 2011; 2 (3): 122–134.
- Sandison, J. C. **A new method for the microscopic study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear.** *Anat Rec*. 1924; 28 (4): 281–287.
- Saniabadi, A. R.; Umemura, K.; Matsumoto, N.; Sakuma, S.; Nakashima, M. **Vessel wall injury and arterial thrombosis induced by a photochemical reaction.** *Thromb Haemost*. 1995; 73 (5): 868–872.
- Sapoznik, Stav; Cohen, Batya; Tzuman, Yael; Meir, Gila; Ben-Dor, Shifra; Harmelin, Alon; Neeman, Michal. **Gonadotropin-regulated lymphangiogenesis in ovarian cancer is mediated by LEDGF-induced expression of VEGF-C.** *Cancer Res*. 2009; 69 (24): 9306–9314.
- Schoch, Angela; Thorey, Irmgard S.; Engert, Julia; Winter, Gerhard; Emrich, Thomas. **Comparison of the lateral tail vein and the retro-orbital venous sinus routes of antibody administration in pharmacokinetic studies.** *Lab animal*. 2014; 43 (3): 95–99.
- Sckell, Axel; Leunig, Michael. **The Dorsal Skinfold Chamber: Studying Angiogenesis by Intravital Microscopy.** *Methods Mol Biol*. 2009; 467: 305–317.
- Sharma, Ankur; Yeow, Wen-Shuz; Ertel, Adam; Coleman, Ilsa; Clegg, Nigel; Thangavel, Chellappagounder et al. **The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression.** *J. Clin. Invest*. 2010; 120 (12): 4478–4492.
- Shultz, Leonard D. **Immunological mutants of the mouse.** *Am J Anat*. 1991; 191 (3): 303–311.
- Sitohy, asel; Nagy, Janice A.; Dvorak, Harold F. **Anti-VEGF/VEGFR Therapy for Cancer: Reassessing the Target.** *Cancer Res*. 2012; 72 (8): 1909–1914.
- Sliva, Katja; Schnierle, Barbara S. **Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA.** *Virol J*. 2010; 7 (1): 248.
- Socher, M.; Kuntz, J.; Sawall, S.; Bartling, S.; Kachelrieß, M. **The retrobulbar sinus is superior to the lateral tail vein for the injection of contrast media in small animal cardiac imaging.** *Lab Anim*. 2014; 48 (2): 105–113.
- Sounni, Nor Eddine; Noel, Agnès. **Targeting the Tumor Microenvironment for Cancer Therapy.** *Clin Chem*. 2013; 59 (1): 85–93.

- Stanelle, Jens; Pützer, Brigitte M. **E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics.** *Trends Mol Med.* 2006; 12 (4): 177–185.
- Stevens, Craig; La Thangue, Nicholas B. **E2F and cell cycle control: a double-edged sword.** *Arch Biochem Biophys.* 2003; 412 (2): 157–169.
- Stylianopoulos, Triantafyllos; Martin, John D.; Snuderl, Matija; Mpekris, Fotios; Jain, Saloni R.; Jain, Rakesh K. **Coevolution of solid stress and interstitial fluid pressure in tumors during progression.** Implications for vascular collapse. *Cancer Res.* 2013; 73 (13): 3833–3841.
- Su, Jen-Liang; Yang, Pan-Chyr; Shih, Jin-Yuan; Yang, Ching-Yao; Wei, Lin-Hung; Hsieh, Chang-Yao et al. **The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells.** *Cancer Cell.* 2006; 9 (3): 209–223.
- Su, Jen-Liang; Yen, C-J; Chen, P-S; Chuang, S-E; Hong, C-C; Kuo, I-H et al. **The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression.** *Br J Cancer.* 2007; 96 (4): 541–545.
- Suzuki, Hiroyuki; Watabe, Tetsuro; Kato, Mitsuyasu; Miyazawa, Keiji; Miyazono, Kohei. **Roles of vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling in differentiation of mouse embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells into endothelial cells.** *Blood.* 2005; 105 (6): 2372–2379.
- Takahashi, Satoru. **Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy.** *Biol Pharm Bull.* 2011; 34 (12): 1785–1788.
- Talmadge, James E.; Fidler, Isaiah J. **AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective.** *Cancer Res.* 2010; 70 (14): 5649–5669.
- Trimarchi, Jeffrey M.; Lees, Jacqueline A. **Sibling rivalry in the E2F Family.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002; 3 (1): 11–20.
- Vajkoczy, Peter; Farhadi, Mohammad; Gaumann, Andreas; Heidenreich, Regina. **Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2.** *J Clin Invest.* 2002; 109 (6): 777–785.
- Vajkoczy, Peter; Ullrich, Axel; Menger, Michael D. **Intravital Fluorescence Videomicroscopy to Study Tumor Angiogenesis and Microcirculation.** *Neoplasia.* 2000; 2 (1-2): 53–61.
- Vollmar, Brigitte; Laschke, Matthias W.; Rohan Richard; Koenig Jochem; Menger, Michael D. **In Vivo Imaging of Physiological Angiogenesis from Immature to Preovulatory Ovarian Follicles.** *Am J Pathol.* 2001; 159 (5): 1661–1670.
- Xanthoulis, Athanasios. **E2F transcription factors and digestive system malignancies: How much do we know?** *World J Gastroenterol.* 2013; 19 (21): 3189–3198.
- Yamasaki, L.; Jacks, T.; Bronson, R.; Goillot, E.; Harlow, E.; Dyson, N. J. **Tumor Induction and Tissue Atrophy in Mice lacking E2F-1.** *Cell.* 1996; 85 (4): 537–548.
- Yardeni, Tal; Eckhaus, Michael; Morris, H. Douglas; Huizing, Marjan; Hoogstraten-Miller, Shelley. **Retro-orbital injections in mice.** *Lab Anim.* 2011; 40 (5): 155–160.
- Yeom, Chan Joo; Goto, Yoko; Zhu, Yuxi; Hiraoka, Masahiro; Harada, Hiroshi. **Microenvironments and cellular characteristics in the micro tumor cords of malignant solid tumors.** *Int J Mol Med.* 2012; 13 (11): 13949–13965.
- Yoo, So Young; Kwon, Sang Mo. **Angiogenesis and Its Therapeutic Opportunities.** *Mediators Inflamm.* 2013; 2013 (1): 1–11.

Young, Robin J.; Reed, Malcom W.R. **Anti-angiogenic Therapy: Concept to Clinic.** *Microcirculation*. 2012; 19 (2): 115–125.

Zetter, Bruce R. **Angiogenesis and Tumor Metastasis.** *Annu Rev Med*. 1998; 49 (1): 407–424.

IV. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Brigitte Vollmar, der Direktorin des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie, für die Themenvergabe und die Möglichkeit diese Arbeit an ihrem Institut durchzuführen. Ihre Betreuung, ihre stete Unterstützung und ihre konstruktive Kritik haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Prof. Brigitte M. Pützer, der Direktorin des Instituts für Experimentelle Genterapie und Tumorforschung, Herrn Dr. David Engelmann und Frau Dr. Deborah Goody für die professionelle Zusammenarbeit, die konstruktiven Diskussionen und die Vorbereitung der zu transplantierenden Tumorzellen.

Für die geduldige und fachkundige Anleitung beim Erlernen der Rückenhautkammerpräparation und Epi-Illumineszenzmikroskopie gebührt meinem Kommilitonen Herrn Dr. Eberhard Grambow großer Dank.

Für die vielfältige Unterstützung bedanke ich mich bei Frau Dr. Kerstin Abshagen, Frau Dr. Antje Butschkau, Frau Dr. Berit Genz und Herrn PD Dr. Dietmar Zechner.

Ebenso bedanke ich mich beim medizinisch-technischen Personal des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie, insbesondere Frau Dorothea Frenz, Frau Berit Blendow und Frau Maren Nerowski, die mir durch unermüdliche Unterstützung und fachliches Wissen bei der Durchführung der Studie sehr geholfen haben.

Darüber hinaus bedanke ich mich beim Tierpflegepersonal der zentralen Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock für die vielen Tipps zum Umgang mit den Tieren und die intensive Pflege der Mäuse.

An dieser Stelle möchte ich meiner Frau für ihre Liebe, ihre Geduld, ihr stetes Interesse an meiner Arbeit und ihre Unterstützung danken. Auch gebührt meinem kleinen Sohn viel Dank für die positive Energie und die Stunden seines, als auch meines ruhigen Schlafs. Ganz besonderer Dank für ihre Hilfe und Unterstützung während der Fertigstellung der Arbeit gilt meiner Patentante.

V. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keinem anderen Prüfungsamt vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Christian Paul Mayrhofer

VI. Curriculum Vitae

Name Christian P. Mayrhofer

Geburtsdatum [REDACTED] 1988

Geburtsort Wien, Österreich

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Ausbildung

1995 - 99 Kolonitz-Volksschule, Wien, Österreich

1999 - 01 Kardinal von Galen Gymnasium, Münster, Deutschland

2001 - 07 Europäische Schule Luxemburg, Luxemburg

2007 Europäisches Abitur

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

2007 - 13 Studium der Humanmedizin, Universität Rostock

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Seit März 2010 Experimentelle Promotionsarbeit:

„Der Einfluss von E2F1 und VEGFR-3 auf die Neoangiogenese am amelanotischen Melanom. Eine intravitalmikroskopische Studie im Modell der dorsalen Rückenhautkammer der Maus.“

Themenvergabe: Prof. Dr. med. B. Vollmar, Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock



2013 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Approbation als Arzt

Seit 2014 Assistenzarzt in Weiterbildung am Klinikum für Anästhesie und Intensivmedizin des Städt. Klinikum Karlsruhe

2017 - 18 Einjährige Rotation in die Abteilung für Kardioanästhesie der Helios Klinik für Herzchirurgie Karlsruhe

Originalarbeit

David Engelmann, Deborah Mayoli-Nüssle, **Christian Mayrhofer**, Katharina Fürst, Vijay Alla, Anja Stoll, Kerstin Abshagen, Brigitte Vollmar, Sophia Ran, Brigitte M. Pützer. E2F1 promotes Neovascularization through Activation of the Tumoral VEGF-C/VEGFR-3 Axis in a Feedback Loop for Cooperative Induction of PDGF-B. Journal of Molecular Cell Biology. 2013; 5(6): 391-403

Tagungsbeiträge

C. Mayrhofer, D. Engelmann, B. Pützer, B. Vollmar. New perspectives in the anti-angiogenic treatment of metastatic skin cancer. Vortrag, 15. Chirurgische Forschungstage, 2011 in Dresden, Deutschland. Publiziert in: Langenbeck's Archives of Surgery. 2011; 396: 921

David Engelmann, Deborah M. Nüssle, **Christian Mayrhofer**, Alf Spitschak, Sophia Ran, Brigitte Vollmar, Brigitte M. Pützer. E2F1 Regulates Autologous Vascular Growth Factor Receptor 3 Signaling: New Implications for Antiangiogenic Cancer Therapie. Poster, Emerging Concepts in Cancer, 2012 in Berlin, Deutschland.

VII. Thesen

1. Verminderte Spiegel von e2f1 in amelanotischen Melanomzellen mit hohen endogenen e2f1-Spiegeln führen *in vivo* zur Abnahme des angiogenen Potentials der Tumorzellen.
2. Verminderte Spiegel von vegfr-3 in amelanotischen Melanomzellen mit hohen endogenen e2f1-Spiegeln führen *in vivo* zur Abnahme des angiogenen Potentials der Tumorzellen.
3. Erhöhte Spiegel von e2f1 in amelanotischen Melanomzellen mit niedrigen endogenen e2f1-Spiegeln führen *in vivo* zu stärkerer Neoangiogenese. Die gleichzeitige Reduktion der vegfr-3-Spiegel reduziert diesen Effekt.
4. Bei den entstehenden Neogefäßen handelt es sich um endothelial ausgekleidete Kapillaren.
5. Die durch unterschiedliche e2f1- bzw. vegfr-3-Spiegel veränderten Tumorgefäßdichten verändern das Größenwachstum der Mikrotumore nicht.